

Procedimiento de Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica



14b.

Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinario

Editores

Emilia Cercenado Mansilla
Rafael Cantón Moreno

Coordinador

Yuliya Zboromyrska

Autores

Yuliya Zboromyrska
Marina de Cueto López
Carles Alonso-Tarrés
Victoria Sánchez-Hellín



ISBN: xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

EDITORES:

Emilia Cercenado Mansilla. Servicio de Microbiología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid.
Rafael Cantón Moreno, Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal e Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS). Madrid.

SUGERENCIA DE CITACIÓN:

Zboromyrska Y, de Cueto López M, Alonso-Tarrés C, Sánchez-Hellín V. 2019. 14b. Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinario. Zboromyrska Y (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Micro-biología Clínica (SEIMC). 2019.

AVISO:

Reservados todos los derechos. Los documentos SEIMC o cualquiera de sus partes no podrán ser reproducidos, almacenados, transmitidos, distribuidos, comunicados públicamente o transformados mediante ningún medio o sistema sin la previa autorización de sus responsables, salvo excepción prevista por la ley. Cualquier publicación secundaria debe referenciarse incluyendo “Este documento ha sido elaborado por la SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica) y su contenido puede encontrarse en la página web www.seimc.org”

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores:

Emilia Cercenado Mansilla

Rafael Cantón Moreno

14b. Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinario. 2019

Coordinadora:

Yuliya Zboromyrska¹

Autores:

Yuliya Zboromyrska¹

Marina de Cueto López²

Carles Alonso-Tarrés³

Victoria Sánchez-Hellín⁴



¹Servicio de Microbiología. Hospital Clínic (Barcelona), ²Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Virgen Macarena (Sevilla), ³Servicio de Microbiología. Fundación Puigvert (Barcelona), ⁴Servicio de Microbiología. Hospital General Universitario de Elche (Alicante)

INDICE DE CONTENIDOS

1.	Introducción.....	6
2.	Etiología y perfil de resistencia a antimicrobianos de los patógenos urinarios.....	6
	2.1. Etiología de las infecciones del tracto urinario.....	6
	2.2. Perfiles de resistencia a los antimicrobianos.....	7
3.	Microbiota urinaria.....	9
4.	Patogenia de la infección urinaria.....	10
5.	Consideraciones clínicas.....	11
	5.1. Cistitis.....	12
	5.2. Pielonefritis.....	12
	5.3. Bacteriuria asintomática.....	13
	5.4. Infección urinaria recurrente.....	14
	5.5. Infección urinaria en paciente sondado.....	14
	5.6. Infección urinaria en varones.....	15
	5.6.1 Prostatitis.....	15
	5.6.2 Epididimitis.....	16
	5.6.3 Orquitis.....	16
	5.7. Infección urinaria en pediatría.....	16
	5.8. Infección urinaria en el embarazo.....	17
	5.9. Infección urinaria en paciente con trasplante renal.....	17
	5.10. Infección urinaria por micobacterias.....	18
6.	Indicaciones del urocultivo.....	18
7.	Obtención, transporte y conservación de muestras.....	19
	7.1 Obtención de muestras.....	19
	7.1.1 Obtención de muestras de orina de micción media.....	19
	7.1.2 Obtención de muestras de orina por sondaje vesical.....	19
	7.1.3 Obtención de muestras de orina en pacientes con sondaje permanente.....	20
	7.1.4 Obtención de muestras de orina en niños mediante bolsas colectoras.....	20
	7.1.5 Obtención de muestra de orina por punción suprapúbica.....	20
	7.1.6 Obtención de muestras de orina de nefrostomía.....	21
	7.1.7 Obtención de muestra para el diagnóstico de prostatitis crónica.....	21
	7.2 Volumen mínimo de la muestra según el estudio solicitado.....	22
	7.3 Transporte y conservación.....	23
8.	Procesamiento de la muestra en el laboratorio.....	23
	8.1 Técnicas para detección de leucocituria y/o bacteriuria.....	23
	8.1.1 Tira reactiva.....	23
	8.1.2 Examen microscópico.....	24
	8.1.2.1 Examen de orina sin teñir.....	24
	8.1.2.2 Tinción de Gram.....	25
	8.1.3 Sistemas automáticos.....	25
	8.1.3.1 Sistemas automáticos de microscopía de orina.....	25
	8.1.3.2 Citometría de flujo.....	26
	8.1.4 Evaluación de las técnicas empleadas para el cribado de orinas.....	26
	8.2 Urocultivo.....	28
	8.2.1 Medios de cultivo.....	28
	8.2.2 Siembra.....	29
	8.2.3 Condiciones de incubación.....	30
	8.2.4 Lectura e interpretación de los resultados cuantitativos.....	30

8.3	Sistemas automatizados de procesamiento de muestras de orina.....	31
8.4	Métodos de identificación de patógenos urinarios.....	33
8.4.1	A partir de cultivo.....	33
8.4.2	A partir de muestra directa.....	34
8.5	Estudio de sensibilidad de patógenos urinarios.....	37
8.5.1	Métodos convencionales.....	37
8.5.2	Técnicas rápidas de detección de resistencias a partir de cultivo o muestra directa.....	38
8.5.2.1	MALDI-TOF.....	38
8.5.2.2	Pruebas colorimétricas.....	40
8.5.2.3	Inmunocromatografía.....	42
8.5.2.4	Métodos moleculares.....	43
9.	Información de resultados.....	43
9.1	Información de resultados de microscopía y de citometría de flujo.....	43
9.2	Información de resultados del cultivo.....	43
9.3.	Información de resultados de estudio de sensibilidad.....	44
10.	Papel de la orina para el diagnóstico de otro tipo de infecciones.....	45
10.1	Detección de antígenos de <i>Streptococcus pneumoniae</i> y <i>Legionella pneumophila</i>	45
10.1.1	Inmunocromatografía.....	44
10.1.2	ELISA.....	45
10.1.3	Inmunoensayo fluorescente.....	46
10.2	Leptospirosis.....	46
10.3	Esquistosomiasis.....	46
10.4	Infecciones víricas.....	47
11.	Calidad en los estudios de orina.....	47
12.	Bibliografía.....	48

DOCUMENTOS TÉCNICOS

ÍNDICE DE LOS DOCUMENTOS TÉCNICOS

PNT-UR-01 Procesamiento microbiológico de la orina

PNT-UR-03 Diagnóstico microbiológico de la prostatitis bacteriana crónica

PNT-UR-04 Identificación de microorganismos a partir de la muestra directa de orina mediante MALDI-TOF

PNT-UR-05 Detección de carbapenemasas y BLEE mediante pruebas colorimétricas a partir de colonia y muestra directa de orina

1. INTRODUCCIÓN

La infección del tracto urinario (ITU) es una de las infecciones más frecuentes. Según el último Estudio de la Prevalencia de la Infección Nosocomial en España (EPINE-EPPS 2018), en su informe nº 29 sobre prevalencia de las infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria (IRAS) e infecciones comunitarias, las ITU representan la segunda causa de infección en Atención Primaria (AP) (18,4%) después de las infecciones respiratorias y la tercera causa de IRAS (17,4%) después de las infecciones quirúrgicas y respiratorias.

La incidencia de las ITU varía con el sexo y con la edad. A partir de los 3 meses de vida y hasta los 50-65 años, las mujeres tienen ITU con mucha mayor frecuencia que los hombres, estimándose que un 20% de las mismas la padecerá a lo largo de su vida. La cistitis aguda no complicada en la mujer joven es la infección más prevalente con un pico de incidencia en los años de máxima actividad sexual. Se estima que en España alrededor de 4.000.000 de mujeres de entre 20 y 44 años desarrollan al año una cistitis aguda. A partir de los 65 años, la incidencia aumenta en ambos sexos, más marcadamente en varones coincidiendo con patología prostática.

Según el EPINE-EPPS 2018, las ITU son la primera causa de infección en áreas de geriatría (33,6%), rehabilitación (65%) y en centros de larga estancia (50%). Este estudio también muestra que el 52% de las infecciones urinarias están asociadas a la sonda urinaria (hasta el 16% de los pacientes hospitalizados son portadores de una sonda uretral en algún momento de su estancia). Su frecuencia se relaciona con la duración del sondaje urinario, con la utilización de sistemas de drenaje cerrados vs abiertos y con la calidad de los cuidados del personal sanitario. El 10,1% de las bacteriemias nosocomiales y el 28,8% de las bacteriemias comunitarias son secundarias a ITU, siendo el segundo foco en bacteriemia nosocomial después del catéter vascular central confirmado microbiológicamente (24,5%) y el primer foco en pacientes en AP.

2. ETIOLOGÍA Y PERFIL DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS DE LOS PATÓGENOS URINARIOS

2.1 ETIOLOGÍA DE LAS INFECCIONES DEL TRACTO URINARIO

La etiología de las ITU depende de muchos factores, tales como la edad, el sexo, las enfermedades de base, la presencia de trastornos funcionales o anatómicos del tracto urinario, el origen comunitario o nosocomial de la ITU, el uso de cateterismo prolongado o intermitente, instrumentación, antecedentes de hospitalización reciente, institucionalización o tratamientos antibióticos previos.

La mayoría de las ITU están causadas por *Escherichia coli* uropatógeno, responsable de 70-95% de casos de cistitis y pielonefritis no complicadas. Se han descrito seis grupos filogenéticos de *E. coli*: A, B1, B2, C, D y E. La mayoría de las cepas de *E. coli* involucradas en ITU pertenecen al filogrupo B2 y poseen múltiples factores de virulencia.

Además de *E. coli*, en episodios de cistitis aguda se aíslan *Staphylococcus saprophyticus* (5-10%), en mujeres jóvenes entre 15-25 años, *Klebsiella pneumoniae* o *Proteus mirabilis*. En mujeres con cistitis aguda no complicada, es muy dudoso el valor de *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus agalactiae* cuando se aíslan en cultivos de muestras de micción media, aún en recuentos de $\geq 10^4$ UFC/mL. Se ha demostrado que estos microorganismos no se encuentran en cultivos de orina obtenida por sondaje vesical al mismo tiempo. Por el contrario, el cultivo de muestras de micción media con aislamiento de 10^2 UFC/mL de *E. coli*, resulta altamente predictivo de verdadera bacteriuria con una sensibilidad de 94%, especificidad de 89% y valor predictivo positivo de 93%. En las gestantes, el aislamiento de *S. agalactiae* puede representar tanto

ITU sintomática como colonización. En pielonefritis aguda la etiología es similar a la cistitis, con similares patrones de resistencia a los antibióticos.

En las ITU recurrentes y complicadas, las enterobacterias causan entre el 60% y el 75% de las infecciones, con *E. coli* como agente causal más frecuente. *P. mirabilis* se aísla sobre todo en personas ancianas y en pacientes portadores de sonda vesical permanente. En esta población de pacientes no es infrecuente el aislamiento de *Providencia* spp., *Morganella* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp. o *Serratia* spp. Entre otros bacilos Gram-negativos hay que destacar *Pseudomonas aeruginosa*, que se aísla sobre todo en infecciones nosocomiales en pacientes con cateterismo prolongado.

Las bacterias Gram-positivas son menos frecuentes: *S. agalactiae* en el recién nacido, personas ancianas y diabéticas; *Enterococcus* spp. en ancianos, portadores de sonda vesical y en personas con tratamiento previo con cefalosporinas; *Corynebacterium urealyticum* en pacientes con patología urológica o sondaje vesical permanente; *Staphylococcus aureus* causa cistitis sobre todo en pacientes con sonda vesical o puede ser causa de pielonefritis por vía hematológica. A pesar de que la mayoría de ITU son monomicrobianas, en el caso de sondaje prolongado y presencia de otros dispositivos en el tracto urinario (*stent*, etc.) es frecuente el aislamiento de más de una especie de microorganismos, siendo habitual el aislamiento de microorganismos distintos de *E. coli*, tales como *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis*, *Candida* spp. y estafilococos.

El aislamiento de *Candida* spp. en muestras de orina generalmente representa una contaminación y para diferenciarla de una infección se recomienda siempre obtener una segunda muestra para verificar la candiduria; si el paciente está sondado es necesario cambiar la sonda, en pacientes que no controlan esfínteres, ancianos y otros pacientes en los que no es posible obtener una muestra de calidad por micción espontánea, se requiere obtener la muestra de orina por sondaje vesical. La mayoría de los pacientes con candiduria son asintomáticos y la presencia de *Candida* spp. en orina no traduce una verdadera ITU. En los pacientes con factores predisponentes (diabetes mellitus, sonda permanente, antibioticoterapia etc.) generalmente, la candiduria se resuelve al corregir dichos factores sin necesidad de tratamiento antifúngico. Por el contrario, en recién nacidos de bajo peso, en pacientes críticos y neutropénicos, la candiduria, sintomática o no, puede ser un signo de infección sistémica y requiere la obtención de hemocultivos y la realización de otras pruebas diagnósticas. La infección sintomática es poco frecuente y puede presentarse en forma de cistitis o pielonefritis. La prostatitis y orquiepididimitis son excepcionales. Una vez confirmada la etiología se requiere establecer tratamiento antifúngico y en prostatitis y orquiepididimitis se requiere además drenaje quirúrgico.

Otros patógenos descritos excepcionalmente en casos de cistitis o pielonefritis aguda son: *Haemophilus influenzae* y *H. parainfluenzae*, *Gardnerella vaginalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Ureaplasma urealyticum* y *Actinomyces* spp. El aislamiento y/o detección por técnicas moleculares de estas especies bacterianas debe valorarse junto con los datos clínicos y los resultados de otros estudios. Del mismo modo, se deberá valorar el procesamiento individualizado de la orina en caso de sospecha diagnóstica específica, como ocurre en el caso de la mujer con síndrome uretral agudo, piuria y urocultivo negativo, en cuyo caso se debe investigar *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium* y virus herpes simple, o en el caso de adultos con piuria y urocultivo repetidamente negativo, en que se debe investigar *Mycobacterium tuberculosis*. En los pacientes con fístulas enterovesicales los microorganismos anaerobios pueden estar implicados en los cuadros de ITU.

En los últimos años se han descrito “nuevos uropatógenos”, tales como *Aerococcus* (*A. urinae*, *A. urinaehominis*, *A. viridans* y *A. sanguinicola*), *Oligella* (*O. ureolytica* y *O. urethralis*) y una amplia variedad de géneros del filo Actinobacteria, incluyendo *Gardnerella*, *Actinobaculum* (*A. massiliense*), *Actinotignum* (*A. schaalii* y *A. urinale*), *Corynebacterium* y *Actinomyces*. Algunas de estas especies se han descrito en casos de ITU asociadas a sonda vesical permanente (*Aerococcus* y *Oligella*), o incluso en casos de urosepsis (*Aerococcus* y *Actinotignum*). *A. schaalii* se está presentando como un uropatógeno emergente, particularmente en ancianos y personas con anomalías urológicas subyacentes. Según los estudios retrospectivos y series de casos publicados, aproximadamente el 85% de las infecciones se producen en el

tracto urinario (cistitis, pielonefritis o urosepsis) o se diseminan (bacteriemia, endocarditis) a partir de una fuente primaria desconocida. En cuanto a los aislamientos de bacilos Gram-positivos diferomorfos, se han comunicado casos de ITU causada por *C. urealyticum*, *C. glucuronolyticum*, *C. striatum*, *C. aurimucosum* y *Actinomyces neuii*. Pocos de estos géneros han sido aceptados como verdaderos uropatógenos, sobre todo por su presencia en la microbiota urogenital de pacientes asintomáticos. Por lo tanto, el aislamiento de estas especies debe ser valorado minuciosamente junto con los datos clínicos del paciente.

En cuanto a la etiología vírica, aun siendo muy poco frecuente, cabe mencionar los adenovirus como etiología de cistitis hemorrágica epidémica en pediatría, el virus BK en casos de cistitis hemorrágica en receptores de trasplante de médula ósea, y citomegalovirus, que puede producir cistitis en personas inmunodeprimidas.

2.2. PERFILES DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS

En los últimos años se ha producido un incremento global de la resistencia a antimicrobianos, principalmente en bacilos Gram-negativos. En las ITU, en la mayoría de las ocasiones el tratamiento antibiótico se instaura de forma empírica, siendo necesario conocer la epidemiología y las tasas de resistencias locales, algo fundamental en el caso de las enterobacterias, y particularmente de *E. coli*.

En un estudio publicado en 2019, donde se compararon las guías de tratamiento de ITU en 15 países europeos, las tasas de resistencia de *E. coli* en España (datos procedentes de estudios nacionales y regionales) fueron del 5% para nitrofurantoína y del 3% para fosfomicina, dos antibióticos con indicación específica en ITU. Estos datos confirman la elección de estos dos antibióticos para el tratamiento empírico de primera línea para la cistitis no complicada. Por norma general, la tasa de resistencia de un antibiótico debe ser <20% para usarlo en tratamiento empírico de cistitis. En cuanto a cotrimoxazol, los estudios regionales muestran tasas de resistencia variables, pero en general oscilan en torno al 30%.

En el estudio SMART para la vigilancia de la sensibilidad antimicrobiana de microorganismos Gram-negativos procedentes de infección intraabdominal e ITU, realizado en 10 hospitales españoles durante los años 2016 y 2017, se analizaron 937 cepas aisladas de pacientes con ITU. *E. coli* representó 63,3% en infección comunitaria y 44,9% en infección nosocomial con una tasa global de *E. coli* productor de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) de 8,1%, con diferencias significativas entre ITU comunitaria (6,3%) y nosocomial (10,4%). El segundo microorganismo más frecuentemente aislado en ITU fue *K. pneumoniae* con una tasa de cepas productoras de BLEE de 32,6% (28,7% en infección comunitaria y 34,5% en infección nosocomial). Se observó un incremento de *Enterobacterales* productoras de BLEE al aumentar la edad de los pacientes, siendo de 8,7% en los menores de 30 años y de 12% en los mayores de 60 años.

Tabla 1. Porcentaje de sensibilidad antibiótica de bacilos Gram-negativos aislados en ITU durante el estudio SMART (2016-2017) (adaptado de Cantón *et al.*, 2019)

Especie	AMC		PTZ		CTX		CAZ		FEP		IMP		ERT		AK		CIP	
	C	N	C	N	C	N	C	N	C	N	C	N	C	N	C	N	C	N
<i>E. coli</i>	77,6	78,2	91,5	90	92,6	86,8	91,5	85,9	92,6	88,6	100	99,5	99,6	99	99,3	98,6	64	61,3
<i>K. pneumoniae</i>	90	100	71,2	69	66,6	63,3	69,7	62,5	69,7	63,3	100	95,6	92,4	84,1	98,4	96,4	59	56,1
<i>K. oxytoca</i>	100	100	88,8	77,7	100	88,8	100	88,8	100	88,8	100	100	100	88,8	100	100	100	77,7
<i>P. mirabilis</i>	100	100	100	100	93,5	100	90,3	96,6	100	100	100	100	100	100	100	100	51,6	56,6
<i>E. cloacae</i>	NA	NA	100	36,3	80	36,3	100	36,3	100	72,7	100	90,9	100	90,9	100	100	100	54,5
<i>C. freundii</i>	NA	NA	100	80	66	80	50	80	100	80	100	80	100	80	100	100	83,3	80
<i>M. morganii</i>	NA	NA	100	92,3	50	84,6	37,5	84,6	100	92,3	87,5	92,3	100	100	100	100	62,5	69,2
<i>S. marcescens</i>	NA	NA	100	100	100	100	100	100	100	100	66,6	100	100	100	100	100	100	75
<i>P. aeruginosa</i>	NA	NA	72,7	77,1	NA	NA	77,2	80	72,7	77,1	81,8	80	NA	NA	95,4	88,5	68,1	68,5

NA, no aplica; C, ITU comunitaria; N, ITU nosocomial; AMC, amoxicilina/ácido clavulánico; PTZ, piperacilina/tazobactam; CTX, cefotaxima; CAZ, ceftazidima; FEP, cefepima; IMP, imipenem; ERT, ertapenem; AK, amikacina; CIP, ciprofloxacino

En cuanto a las tasas de sensibilidad a diferentes antibióticos, *E. coli* presentó una sensibilidad global de 77,7% a amoxicilina/ácido clavulánico, 90,9% a piperacilina/tazobactam, 90,1% a cefotaxima, 99,4% a ertapenem y 63% a ciprofloxacino. Se observó una disminución marcada de sensibilidad a ciprofloxacino para otras Enterobacteriales: 57% en *K. pneumoniae* y 54,1% en *P. mirabilis*. En la [Tabla 1](#) se muestran las tasas de sensibilidad de las principales especies de bacilos Gram-negativos aislados en el estudio SMART, dependiendo de si la ITU es de adquisición comunitaria o nosocomial.

En las últimas décadas se observó una diseminación de cepas de *E. coli* productoras de BLEE tanto a nivel hospitalario como en la comunidad asociado al clon de alto riesgo ST131. Este clon se ha diseminado a nivel mundial encontrándose tanto en ITU como en urosepsis. En el estudio multicéntrico ITU-BRAS, llevado a cabo en 2010-2011 en 8 hospitales de España, se observó que el 54% de *E. coli* BLEE causantes de bacteriemia de foco urinario pertenecían al clon ST131 (filogrupo B2). Todos los aislados, menos uno, correspondían al subclon *H30Rx* que presentaba altos niveles de resistencia a antimicrobianos (producción de BLEE de tipo CTX-M-15 en todos los aislados y co-producción de OXA-1 en todos menos uno). El subclon *H30Rx* es responsable del aumento de la resistencia no solo a betalactámicos sino también a quinolonas. Algunos estudios estiman que el complejo clonal O25b:H4-B2-ST131 puede ser responsable de una de cada 10 infecciones extraintestinales producidas por *E. coli*.

Las carbapenemas siguen siendo un tratamiento de elección para las cepas productoras de BLEE, sobre todo en *E. coli* ([Tabla 1](#)). Sin embargo, en los últimos años se ha producido un incremento de las *Enterobacteriales* productoras de carbapenemasas (EPC). En un estudio de vigilancia del grupo iCREST para evaluar las EPC aisladas de muestras de orina en España, en el que se incluyeron 11.826 muestras de 5 hospitales, la prevalencia de EPC fue del 1,6%. La carbapenemasa tipo OXA-48 fue la más frecuente (86,8%), seguida de KPC (6,9%), VIM (4,8%), NDM (1,1%) e IMP (0,6%). *K. pneumoniae* fue la EPC más frecuentemente aislada (87,8%). No todas las resistencias a carbapenemas se deben a la producción de carbapenemasas. Los defectos de permeabilidad debido a pérdidas de porinas (por ejemplo, OmpK35 y OmpK36 en *K. pneumoniae*), a veces en combinación con hiperproducción de enzimas tipo AmpC también son responsables de dicha resistencia.

El panorama dinámico y cambiante de resistencias entre los uropatógenos más frecuentes exige realizar una vigilancia activa de las cepas circulantes y sus patrones de resistencia antibiótica en cada institución y región geográfica, así como a nivel nacional. Debido a que existen diferencias significativas entre las tasas de resistencia a ciertos antibióticos entre distintas áreas geográficas, es necesario disponer de los datos de sensibilidad locales actualizados que servirán para adecuar las recomendaciones en cuanto al tratamiento empírico de la ITU.

3. MICROBIOTA URINARIA

El proyecto *Human Microbiome* (HMP) (<http://commonfund.nih.gov/hmp/>) surge como una iniciativa del *National Institute of Health* en el año 2008, con el objetivo de identificar y caracterizar las comunidades microbianas presentes en diferentes cavidades del cuerpo humano para buscar las correlaciones entre los cambios en la microbiota y la salud y la enfermedad. Los estudios iniciales del HMP determinaron la composición de la microbiota de la piel sana, del tracto gastrointestinal, de la boca y de la vagina. El tracto urinario no se incluyó inicialmente. Sin embargo, en la actualidad hay suficiente evidencia que pone de manifiesto que existe una microbiota urinaria en población sana y que a su vez, difiere de la microbiota de pacientes con trastornos urológicos. Estos hallazgos rompen con el dogma aceptado durante décadas de que la vejiga es un compartimento estéril. Los microorganismos que habitan el tracto urinario tienen por tanto una función en el mantenimiento de la salud que nos conduce a replantear la gestión de las “infecciones” del tracto urinario debido a la asunción del microbioma urinario o urobioma como órgano implicado en la fisiopatología de la enfermedad urológica. Afortunadamente, las nuevas tecnologías moleculares basadas en la secuenciación masiva del gen que codifica la subunidad 16S del ARN ribosomal (gen ARNr 16S) han sido de gran utilidad para la identificación de bacterias no cultivables en la orina. Muchos investigadores han empleado esta técnica para caracterizar las bacterias directamente en muestras de orina. En general, las bacterias más comunes que forman la microbiota urinaria en la mujer son *Lactobacillus* spp. y en menor grado, *Gardnerella vaginalis*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. y *Corynebacterium* spp. Algunos autores han establecido distintos fenotipos de mujeres en base a su microbiota urinaria individual. Esto ha sido posible debido

que las nueve regiones hipervariables conocidas (V1-V9) del gen ARNr 16S contienen suficientes polimorfismos para lograr una clasificación taxonómica precisa. Estos trabajos se realizaron extrayendo orina directamente de la vejiga mediante aspiración suprapúbica (Wolfe *et al.*, 2012) y/o catéter transuretral (Nienhouse *et al.*, 2014; Pearce *et al.*, 2014; Wolfe *et al.*, 2012) para evitar la contaminación vulvovaginal. La relación entre la microbiota urinaria y la microbiota vaginal es de gran interés, si tenemos en cuenta que existe una superposición significativa entre las bacterias más comunes encontradas en la vejiga y aquellas generalmente asociadas con la salud (*Lactobacillus* spp.) y la enfermedad (*G. vaginalis*) vaginal. Recientemente se han llevado a cabo estudios para identificar el papel del urobioma y el impacto de la disbiosis bacteriana, ya que el desequilibrio homeostático podría estar implicado en el desarrollo de enfermedad urológica. Así en algunos estudios se ha observado una frecuencia mayor de los géneros *Actinobaculum*, *Actinomyces*, *Aerococcus*, *Arthrobacter* y *Oligella* en la orina de las mujeres que presentaban incontinencia respecto al grupo control. Estos nuevos conocimientos sientan las bases para el desarrollo de estudios que conduzcan a nuevos enfoques preventivos y terapéuticos de los trastornos del tracto urinario.

4. MANEJO DE LA MUESTRA EN SU RECEPCIÓN EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

El desarrollo de una ITU es un proceso complejo donde intervienen tanto los factores relacionados con el microorganismo causante como con el huésped. Entre los principales factores de riesgo en mujeres premenopáusicas hay que mencionar: la actividad sexual, el uso de espermicidas, familiares de primer grado con historia de ITU o ITU en la infancia. En las mujeres postmenopáusicas los factores de riesgo comprenden la historia previa de ITU, incontinencia urinaria, vaginitis atrófica debido a la depleción estrogénica, cistocele, aumento del volumen del residuo postmiccional y fenotipo no secretor de los grupos sanguíneos ABH.

Las alteraciones anatómicas y funcionales del tracto urinario son responsables de ITU complicadas e incluyen cirugía urogenital, sonda vesical permanente u otros tipos de catéteres de uso prolongado, obstrucción de vías urinarias, vejiga neurogénica o reflujo vesicoureteral. Las enfermedades de base, tales como diabetes mellitus o estados de inmunosupresión, son otros factores predisponentes. En los pacientes mayores concurren muchos de los factores de riesgo antes mencionados, y además hay que añadir el deterioro mental y tratamientos antimicrobianos más frecuentes. En los varones de entre 15 y 50 años la ITU es poco frecuente y suele estar asociada a una alteración urológica subyacente. En los varones mayores de 50 años los síntomas se deben mayoritariamente a la prostatitis crónica y los factores de riesgo están relacionados con la obstrucción de las vías urinarias de distinta índole o cateterismo prolongado.

La mayoría de las ITU se producen por vía ascendente por la colonización de la zona periuretral y de la uretra con microorganismos de origen intestinal. La microbiota fecal constituye un importante reservorio para uropatógenos, sobre todo para *E. coli*. *E. coli* uropatógena (ECUP) forma parte de un grupo de *E. coli* patogénica extraintestinal que se caracteriza por presentar distintos factores de virulencia. La mayoría de las cepas pertenecen al filogrupo B2, que es responsable del 69% de las cistitis, el 67% de las pielonefritis y el 72% de las sepsis urinarias. Entre los principales factores de virulencia se encuentran adhesinas, toxinas (α -hemolisina, CNF-1, Sat, Vat), sistemas de captación de hierro (sideróforos), flagelos, etc. Pero para que se produzca una ITU los uropatógenos deben superar las barreras de defensa fisiológicas, y la primera es la microbiota vaginal.

Las mujeres con un microbiota vaginal normal (compuesta principalmente por *Lactobacillus* spp.) tienen un menor riesgo de infección urinaria en comparación con las mujeres con microbiota más diversa constituida por anaerobios Gram-negativos, actinobacterias y otros Firmicutes. Concretamente, las mujeres con vaginosis bacteriana tienen un mayor riesgo de ITU. Los estudios realizados para evaluar el impacto de la vaginosis bacteriana muestran un riesgo de ITU entre 2,2 a 13,7 veces mayor. Muchos de los factores de riesgo citados, tales como antibioticoterapia o depleción de estrógenos, en realidad actúan alterando la microbiota vaginal normal, facilitando a los uropatógenos el acceso al tracto urinario. Las especies de *Lactobacillus* interfieren en la adherencia de microorganismos al epitelio mediante la producción de sustancias como el ácido láctico, el peróxido de hidrógeno y otras moléculas "defensivas" que crean un ambiente hostil para los posibles uropatógenos, pero también al ocupar sitios de unión en el epitelio genitourinario, competir por

nutrientes limitados o inhibir la proliferación de microorganismos. Las especies más frecuentemente aisladas son *L. crispatus*, *L. gasseri* y *L. jensenii*. Según algunos estudios dos de estas especies pueden presentar diferentes e incluso opuestos roles en la patogenia de enfermedades urológicas: mientras *L. crispatus* se postula como una especie protectora (probióticos para el control de la ITU recurrente), *L. gasseri* se ha asociado con trastornos urológicos, aunque faltan más estudios para confirmar estos hallazgos. De modo que en la patogenia de la ITU tienen un papel importante tres microbiotas: la intestinal, que habitualmente alberga uropatógenos causantes de ITU, la vaginal, cuyas alteraciones tienen un impacto directo en la predisposición de las mujeres a las ITU y la microbiota urinaria, de la que todavía disponemos de muy pocos datos. Recientemente algunos casos publicados sobre pacientes a los que se les realizó el trasplante fecal en el contexto de la infección por *Clostridioides difficile*, apuntan que este método también puede prevenir las recurrencias de ITU. El mecanismo no está claro pero probablemente tiene que ver con la composición del microbiota fecal de los pacientes con ITU recurrente.

En la cistitis aguda, una vez que ECUP llega a la vejiga se une a las células epiteliales mediante las fimbrias. La fimbria tipo 1 es el factor de adherencia principal en *E. coli*, ya que los receptores celulares para estas adhesinas son más abundantes en la mucosa vesical que en el uroepitelio alto. Parte de las bacterias que se encuentran adheridas se introducen en las células epiteliales de la vejiga. En el citoplasma de las células, ECUP desarrolla posteriormente masas clonales similares a biopelículas denominadas comunidades bacterianas intracelulares (CBI). Como parte de la respuesta del huésped, las células epiteliales de la vejiga expulsarán activamente ECUP liberando CBI en la orina. La respuesta del huésped ante la invasión de uropatógenos es responsable de exfoliación de las capas superficiales del urotelio vesical. En la orina de mujeres y niños infectados se pueden observar células que contienen CBI, lo que respalda su relevancia clínica. Algunas de estas bacterias continuarán infectando el epitelio de la vejiga inmadura que se expone después de la exfoliación, formando más tarde depósitos intracelulares inactivos, que evitan el aclaramiento inmune y resisten el tratamiento antibiótico sistémico. Estas ECUP persistentes pueden resurgir, en respuesta a señales actualmente indefinidas, para causar la cistitis recurrente. En cuanto a otros uropatógenos, *S. saprophyticus* y *K. pneumoniae* también han mostrado ciclos de vida intracelulares similares a ECUP en modelos experimentales de infección urinaria aguda murina. Respecto a *E. faecalis* se desconoce el mecanismo por el cual invade las células uroteliales. Sin embargo, se sabe que *E. faecalis* puede invadir las células epiteliales intestinales mediante la producción de una sustancia de agregación y, por lo tanto, es posible que un mecanismo similar esté involucrado en la invasión urotelial.

La patogenia de la ITU asociada a las sondas permanentes es distinta. Las bacterias que colonizan las sondas proceden tanto de la microbiota fecal como de la piel. Como las sondas facilitan el acceso de los microorganismos al tracto urinario, la ITU en esta población de pacientes la pueden producir patógenos mucho menos virulentos que en los pacientes no sondados. La inserción del catéter urinario provoca un ambiente inflamatorio en la vejiga, que se manifiesta como exfoliación, edema y lesiones de la mucosa. Tanto la mucosa dañada como el catéter ofrecen superficies para la adhesión bacteriana. Los microorganismos adheridos a la sonda tienden a formar las biopelículas, que ofrecen resistencia a las defensas del huésped y a los antibióticos. Aproximadamente el 50% de los pacientes con cateterismo prolongado (>28 días) experimentan un bloqueo del catéter por depósitos de cristales, siendo la actividad ureasa de *P. mirabilis* la causa más común de esta complicación. Los cristales pueden formarse dentro de la luz de los catéteres, bloqueando el flujo de orina, y también en los túbulos o la pelvis renales, causando inflamación y a menudo requiriendo extracción quirúrgica.

La vía hematogena es responsable de una minoría de los casos de ITU producidas casi exclusivamente por *S. aureus*, *Candida* spp., o más raramente por *Salmonella* spp. y *M. tuberculosis*, en el contexto de una infección diseminada que puede afectar otros órganos y sistemas.

5. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Tradicionalmente las infecciones del tracto urinario se han clasificado según su localización como ITU altas (pielonefritis) y bajas (cistitis, uretritis, prostatitis); sin embargo, para establecer el pronóstico y la estrategia terapéutica a seguir, es fundamental distinguir entre ITU complicadas (ITUc) y no complicadas (ITUnc).

Asimismo, se considera el término urosepsis que incluye a la bacteriemia con foco en el tracto urinario.

La ITUnc incluye las cistitis y pielonefritis que ocurren en individuos sanos, fundamentalmente mujeres jóvenes, con un tracto urinario normal. Las ITUc son las que ocurren en pacientes que presentan determinadas condiciones que aumentan el riesgo de adquisición de una ITU o de fracaso del tratamiento. Los factores de riesgo más frecuentes son las alteraciones anatómicas o funcionales del tracto urinario, el sondaje vesical, la instrumentación previa del tracto urinario, la hospitalización reciente y enfermedades sistémicas como diabetes mellitus y estados de inmunodepresión.

Aunque en varones y en ancianos son frecuentes las ITUc, no todas las ITU en estos pacientes deben considerarse, por sí solas, complicadas. Tampoco, la ITU por bacterias multirresistentes debe considerarse siempre como ITUc.

5.1. CISTITIS

La cistitis aguda no complicada es la manifestación más frecuente de la infección del tracto urinario inferior, afecta sobre todo a mujeres jóvenes sexualmente activas y se caracteriza por la aparición de típica sintomatología irritativa: disuria, urgencia, tenesmo vesical y polaquiuria (síndrome miccional). Se suele acompañar de hematuria, ocasionalmente de dolor suprapúbico y más infrecuentemente de febrícula. Como factores de riesgo, además de una cierta asociación familiar en algunos casos, destacan las relaciones sexuales, el uso de espermicidas, diafragma y la historia de ITU previas. En mujeres, la distinción entre cistitis e infección del tracto genital no suele plantear problemas diagnósticos; en general, las vaginitis y cervicitis cursan con prurito, irritación del área genital y leucorrea y la sintomatología se presenta de forma gradual. La probabilidad de cistitis en mujeres jóvenes que presentan al menos dos síntomas típicos (disuria, urgencia, polaquiuria, tenesmo) en ausencia de síntomas que sugieran vaginitis o cervicitis es superior al 90%.

En varones jóvenes, el diagnóstico diferencial debe realizarse con la uretritis que cursa generalmente con disuria y secreción uretral y en varones mayores de 50 años debe descartarse patología prostática, especialmente si presentan ITU recurrente.

En ancianos, la presencia de disuria, urgencia o tenesmo, pueden ser de carácter crónico en relación con hipertrofia prostática en el hombre o prolapso vesical en la mujer y es difícil su valoración como parte del cuadro clínico de una ITU. También, los pacientes portadores de sonda vesical permanente presentan síntomas irritativos producidos por la propia sonda que pueden ser interpretados erróneamente como manifestación de una ITU sintomática.

En los años 80 se acuñó el término "síndrome uretral agudo" para definir un cuadro clínico que se presenta sobre todo en mujeres jóvenes sexualmente activas, con sintomatología de cistitis (urgencia, frecuencia, tenesmo) y cultivo de orina negativo o con recuentos inferiores a 100.000 UFC/mL. Actualmente se sabe que en la mayoría de las ocasiones este cuadro se debe a una cistitis con recuentos bacterianos bajos que posiblemente representan el inicio de la infección; se ha comprobado que estas bacteriurias alcanzan recuentos ≥ 100.000 UFC/mL si no se realiza tratamiento. En otros casos, la sintomatología puede ser debida a uretritis o vaginitis.

5.2. PIELONEFRITIS

La pielonefritis aguda es la infección del parénquima renal y el sistema pielocalicial. La sintomatología se desarrolla entre unas pocas horas y uno o dos días e incluye fiebre elevada, escalofríos, dolor lumbar con puñopercusión positiva y ocasionalmente náuseas y vómitos. Los síntomas irritativos típicos de la ITU, urgencia, frecuencia y tenesmo, pueden preceder a la aparición de la fiebre, pero sólo se presentan en el 20- 40% de los casos de pielonefritis. La presentación clínica inicial puede variar ampliamente desde formas leves subclínicas hasta casos que evolucionan rápidamente a sepsis y shock séptico. Los cuadros más graves son más frecuentes en las pielonefritis complicadas, aunque, también pueden aparecer en mujeres jóvenes sin factores de riesgo.

Los niños suelen presentar síntomas inespecíficos, principalmente vómitos, fiebre y dolor abdominal difuso. Los ancianos portadores o no de sonda vesical pueden no presentar síntomas focales y la fiebre puede ser la única manifestación de la infección. En ocasiones, el cuadro clínico por sí sólo no permite diferenciar cistitis de pielonefritis y entre el 10% y el 30% de pacientes con síntomas de cistitis tienen realmente una pielonefritis subclínica.

La frecuencia de bacteriemia secundaria es variable según las series y oscila entre <10% y >50%; los porcentajes más elevados se presentan en pacientes con patología grave de base, inmunodeprimidos, pacientes con obstrucción del tracto urinario y ancianos. La bacteriemia en pielonefritis no complicada no parece empeorar el pronóstico; sin embargo, una tercera parte de los pacientes con bacteriemia presentan shock séptico que incrementa la mortalidad.

El empeoramiento o la falta de mejoría tras 48-72 horas de la instauración de un tratamiento antibiótico adecuado deben hacer sospechar una complicación que se debe descartar con técnicas de imagen. La obstrucción es la complicación más frecuente, otras complicaciones menos frecuentes son la nefritis focal o nefronía, los abscesos renales y perirrenales y la pielonefritis enfisematosa que se suele presentar en diabéticos, sobre todo en mujeres y es la forma clínica más grave.

Aunque todas las ITU altas son consideradas por muchos autores como ITU complicada, debe diferenciarse entre pielonefritis complicada y no complicada según se presente en pacientes sin factores de riesgo o con patología urológica o sistémica de base.

5.3. BACTERIURIA ASINTOMÁTICA

La infección urinaria asintomática o bacteriuria asintomática (BA) se define por la presencia en orina de ≥ 100.000 UFC/mL con o sin piuria, en ausencia de síntomas de ITU. En mujeres, para confirmar el diagnóstico, se requiere el aislamiento del mismo uropatógeno en dos muestras de orina obtenidas con un intervalo de unas dos semanas. Entre 10% y 60% de mujeres no tienen bacteriuria persistente y el resultado de la segunda muestra es negativo. En hombres una sola muestra es suficiente para establecer el diagnóstico de BA.

La prevalencia de la BA varía según la edad, el sexo y la presencia de anomalías del tracto urinario. En la mujer sana la incidencia de BA se correlaciona con la actividad sexual, aunque también están asociados otros factores como la diabetes mellitus. La prevalencia aumenta desde el 1% en niñas en edad escolar a más del 20% en mujeres de 70 años que viven en la comunidad. En niños y varones jóvenes la BA es infrecuente, pero a partir de los 50 años la prevalencia aumenta en relación con la patología prostática, de forma que en varones mayores de 70 años que residen en la comunidad la prevalencia es del 5 al 15%. En pacientes institucionalizados mayores de 70 años la prevalencia de BA oscila entre el 20% - 50%; esta mayor prevalencia se relaciona posiblemente con una mayor incidencia de comorbilidades y sondaje uretral en esta población. En el paciente portador de sonda urinaria, la adquisición de bacteriuria se incrementa entre el 2-7% por día de sondaje, de forma que en los pacientes con sondaje permanente prolongado la prevalencia de BA es del 100%.

Numerosos estudios han demostrado que no existe un beneficio de la detección sistemática y tratamiento de la BA en ancianos en términos de morbimortalidad. El tratamiento de la BA no reduce el porcentaje de pacientes que desarrollan una ITU sintomática y no modifica la supervivencia con respecto a los pacientes no tratados; sin embargo, se ha comprobado un aumento de infecciones por bacterias multirresistentes en pacientes tratados por BA. En este sentido, la recomendación actual es no realizar detección sistemática ni tratamiento de la BA en ancianos sean o no portadores de sonda vesical. Sin embargo, la elevada prevalencia de bacteriuria en esta población determina que con frecuencia se prescriban antibióticos en base al resultado positivo de un urocultivo. El sobrediagnóstico de ITU en ancianos, especialmente residentes de centros sociosanitarios, ocasiona un inapropiado y excesivo uso de antibióticos que es responsable en gran medida de la aparición de bacterias multirresistentes en estas instituciones. Además, diferentes estudios han demostrado un incremento significativo del riesgo de infección por *C. difficile* en residentes con BA tratados con antibióticos en los 3 meses previos.

Actualmente sólo se recomienda la detección sistemática y tratamiento de la BA en 2 grupos concretos de población: **1)** gestantes: se ha demostrado que el cribado y tratamiento de la BA en el primer trimestre de gestación disminuye el riesgo de pielonefritis gestacional, parto pretérmino y bajo peso al nacer; **2)** pacientes que van a someterse a cirugía urológica o procedimientos urológicos endoscópicos en los que pueda producirse un sangrado de la mucosa: en estos pacientes se ha demostrado que el tratamiento de la BA antes de la intervención disminuye el riesgo de complicaciones infecciosas postquirúrgicas o postinstrumentación. El tratamiento de BA debe ser dirigido, nunca empírico, y basado en los resultados de sensibilidad antibiótica.

Aunque durante años se ha recomendado detección y tratamiento de la BA en niños con reflujo vesicoureteral, en pacientes inmunodeprimidos y en trasplantados de órgano sólido, actualmente no existen evidencias suficientes que avalen estas recomendaciones.

Algunos estudios han demostrado el efecto protector de cepas que producen BA en cuanto al desarrollo de ITU sintomática, lo que respalda las recomendaciones actuales en cuanto al manejo de BA.

5.4. INFECCIÓN URINARIA RECURRENTE

La infección urinaria recurrente (ITUr) se define cuando se presentan tres o más episodios de ITU en un año o 2 episodios en 6 meses. Son un problema clínico frecuente especialmente en mujeres jóvenes sexualmente activas, mujeres postmenopáusicas y en pacientes con patología urológica subyacente.

Las recurrencias pueden ser debidas a reinfecciones o recidivas. La mayoría de las ITUr son debidas a reinfecciones, es decir, nuevas infecciones causadas por el mismo o diferentes microorganismos que se encuentran habitualmente colonizando el tracto digestivo y área perineal. Todos los factores que complican la ITU predisponen a la reinfección; además, aproximadamente un 25% de mujeres jóvenes sexualmente activas y el 15-20% de mujeres mayores de 60 años presentan reinfecciones después de un episodio inicial de cistitis. El principal factor de riesgo de reinfección en mujeres jóvenes es la frecuencia de relaciones sexuales. En mujeres postmenopáusicas, el papel de la actividad sexual es menos relevante y los principales factores de riesgo asociados con ITUr son la incontinencia urinaria, cistocele, vaciado incompleto de la vejiga con presencia de orina residual, historia de ITU antes de la menopausia, cirugía ginecológica previa y diabetes.

La estrategia terapéutica más eficaz para prevenir la ITUr en mujeres sexualmente activas es la profilaxis antibiótica postcoital o continua, según las mujeres relacionen o no la recurrencia con la actividad sexual. En mujeres postmenopáusicas, la administración de estrógenos vaginales ha demostrado ser una medida de prevención muy eficaz. Otras estrategias de prevención como la administración de preparados de arándanos y las vacunas orales o intranasales preparadas a partir de extractos de uropatógenos han mostrado resultados muy variables en los diferentes estudios y en general presentan una eficacia moderada.

En varones, las causas más frecuentes de ITUr son las uropatías obstructivas, sobre todo por hipertrofia de próstata y la prostatitis crónica. En caso de ITUr secundaria a una patología urológica, es fundamental la corrección de la anomalía.

Las recidivas representan el 20% de las recurrencias, suelen presentarse en las primeras dos o tres semanas después de la aparente curación de una ITU y están producidas por el mismo microorganismo que persiste en el tracto urinario. Generalmente se deben a un tratamiento antibiótico corto o inadecuado o a anomalías del tracto urinario.

5.5. INFECCIÓN URINARIA EN EL PACIENTE SONDADO

La mayoría de las ITU asociadas a sondaje vesical son asintomáticas. La ITU asintomática o BA del paciente sondado se define por la presencia en orina de ≥ 100.000 UCF/mL en ausencia de síntomas de infección. Un sólo urocultivo es suficiente para hacer el diagnóstico. Como se ha mencionado, en pacientes con sondaje permanente (≥ 30 días) la prevalencia de bacteriuria es del 100%. Del 10% al 25% de los pacientes con BA desarrollan una ITU sintomática y de estos, entre el 1% y 5% desarrollan bacteriemia.

En los pacientes portadores de sonda permanente, el desarrollo de ITU sintomática incluidas bacteriemia y sepsis grave se relaciona con la obstrucción de la sonda, la bacteriuria por *Serratia marcescens* y la aparición de hematuria relacionada con los recambios traumáticos de la sonda.

Las manifestaciones clínicas de la ITU son mucho menos específicas que las observadas en pacientes no sondados, los síntomas focales suelen estar ausentes y el diagnóstico se basa en la presencia de signos y síntomas de sepsis: fiebre, escalofríos, hipotensión, en ausencia de otro foco de infección. Los síntomas locales, disuria, urgencia suelen presentarse en relación con la retirada de la sonda y de forma crónica en pacientes con sondaje permanente.

Muchos episodios febriles en sondados se resuelven en 24 horas sin intervención, por lo que en pacientes estables puede demorarse el inicio de tratamiento antibiótico vigilando la evolución. La mayoría de estos episodios son debidos a bacteriemias transitorias causadas por los microorganismos introducidos a través de lesiones del urotelio vesical producidas por decúbitos del propio catéter, o bien están en relación con maniobras de retirada e inserción de la sonda.

La aparición de síntomas inespecíficos como anorexia, decaimiento, empeoramiento del estado general o los cambios en las características de la orina no son indicativos de ITU en pacientes sondados y por sí solos, no justifican realizar un urocultivo o la prescripción de tratamiento antibiótico.

5.6. INFECCIÓN URINARIA EN VARONES

5.6.1. Prostatitis

La prostatitis es la infección urinaria parenquimatosa más habitual en el varón entre la segunda y cuarta década de la vida. Se considera el diagnóstico urológico más común en menores de 50 años y el tercero más frecuente en mayores de 50 años tras la hipertrofia benigna y el cáncer de próstata.

La prostatitis bacteriana aguda afecta sobre todo a varones jóvenes y se presenta como un cuadro de comienzo súbito con fiebre y escalofríos acompañados de síntomas urinarios: disuria, polaquiuria y dolor lumbosacro, perineal o suprapúbico. Al tacto rectal existe un aumento del tamaño de la próstata con dolor intenso. No es aconsejable realizar masaje prostático por el riesgo de bacteriemia. Generalmente la infección prostática es secundaria a una ITU, aunque de forma excepcional las bacterias pueden alcanzar la próstata por vía hematógena. Pueden aparecer complicaciones como bacteriemia, orquiepididimitis, abscesos prostáticos o evolucionar hacia la cronificación dando lugar a una prostatitis crónica bacteriana. El diagnóstico clínico no suele presentar dificultades, el urocultivo suele ser positivo y en ocasiones puede producirse una bacteriemia, espontáneamente o tras el examen rectal.

La prostatitis crónica es una infección prostática de al menos 3 meses de duración, suele estar asociada o ser consecuencia de una ITU recidivante. De forma característica los pacientes presentan ITU recurrente por el mismo microorganismo y entre los episodios permanecen asintomáticos. En algunos casos puede ser una complicación de una prostatitis aguda, de una uretritis o una epididimitis. Entre 2%-10% de los adultos presentan síntomas compatibles con prostatitis crónica en algún momento de su vida; sin embargo, la prevalencia real es difícil de estimar debido a limitaciones de los métodos diagnósticos y su confusión con el resto de patología prostática.

Las manifestaciones clínicas pueden estar presentes de forma continua o por episodios y lo más habitual es la existencia de dolor pelviano y síntomas urinarios, disuria, urgencia y frecuencia, micción dolorosa y en algunos casos retención aguda de orina. El tacto rectal es inespecífico variando de una próstata normal y blanda a congestiva y dolorosa.

Para realizar el diagnóstico etiológico de una prostatitis se requiere realizar cultivo de distintas fracciones de orina antes y después de un masaje prostático (ver apartado 7.1.7. de este procedimiento). *E. coli* es con mu-

cho el el agente causal más frecuente, 80% de casos. *Klebsiella* spp., *P. mirabilis*, *E. faecalis* o *P. aeruginosa* también pueden ser causa de prostatitis, pero con mucha menor frecuencia. El aislamiento del microorganismo causante se consigue en tan solo 5-14% de los casos, mientras que el resto de los pacientes se tratan de manera empírica. El papel de *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma genitalium*, como agentes causales de prostatitis crónica, no está totalmente aclarado; sin embargo, en el estudio microbiológico se recomienda incluir técnicas de amplificación de ácidos nucleicos que permitan su detección. En pacientes infectados por el VIH o con otro tipo de inmunosupresión la prostatitis puede estar causada por *Candida* spp., *M. tuberculosis* u otros patógenos poco frecuentes. La infección por *M. tuberculosis* puede plantearse como diagnóstico diferencial en pacientes de áreas endémicas, si se han descartado otras causas de infección.

5.6.2. Epididimitis

Es la infección del epidídimo y puede ser secundaria a ITU o a uretritis por *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* o *M. genitalium*. La uretritis es la causa más frecuente en varones menores de 35 años, mientras que en mayores de esta edad se presenta con mayor frecuencia asociada a patología urológica, manipulación reciente del tracto urinario o prostatitis; en este caso los agentes causales más frecuentes son enterobacterias y *P. aeruginosa*. Clínicamente se manifiesta por dolor e inflamación escrotal, habitualmente unilateral, fiebre y sintomatología urinaria; en ocasiones puede presentarse exudado uretral. La Infección del epidídimo por *M. tuberculosis* es la manifestación más frecuente de la tuberculosis genital en varones. El diagnóstico etiológico requiere obtener muestra de orina o exudado uretral para la detección de patógenos de transmisión sexual y aspirado o biopsia para cultivo de bacterias.

5.6.3. Orquitis

Es la inflamación de uno o ambos testículos, es mucho menos frecuente que la prostatitis y la epididimitis y aunque puede estar producida por bacterias, que generalmente alcanzan el testículo por contigüidad desde el epidídimo, en la mayoría de las ocasiones las orquitis son una infección primaria de etiología vírica. El virus más frecuentemente implicado es el de la parotiditis y con menor frecuencia el virus Coxsackie B. Los síntomas principales son inflamación, dolor, sensación de pesadez, fiebre y síntomas urinarios. Puede haber además uretritis si la infección está causada por un patógeno de transmisión sexual.

Entre otras causas poco frecuentes de orquitis se encuentran la tuberculosis, por extensión desde el epidídimo y, sobre todo en inmigrantes, las filariosis. El diagnóstico se hace por cultivo de muestra obtenida por aspiración o biopsia y serología para descartar infección viral.

5.7. INFECCIÓN URINARIA EN PEDIATRÍA

La prevalencia de las ITU en la población pediátrica es variable según la edad y el sexo. En neonatos la frecuencia de ITU es del 1%-2%, y es más frecuente en varones durante el primer año de vida con una relación niño/niña del orden de 5:1. En la edad preescolar esta frecuencia se invierte, siendo la prevalencia del 5% en mujeres y 0,5% en varones. En éstos, la infección se asocia frecuentemente a anomalías del tracto urinario. Las infecciones en este periodo suelen ser sintomáticas y numerosos estudios han demostrado que las lesiones cicatriciales parenquimatosas asociadas a ITU se producen en esta edad. Durante la edad escolar y antes de la pubertad, la prevalencia de ITU es aproximadamente del 1%, 30 veces más alta en mujeres, estimándose que aproximadamente un 5% de las niñas sufrirá uno o más episodios de ITU en sus años escolares. Aunque tradicionalmente se consideraba que la ITU en recién nacidos y lactantes era de origen bacteriémico, actualmente se sabe que la práctica totalidad de las infecciones se producen, como en el adulto, por vía ascendente y se considera que la bacteriemia que ocurre en el 10%-30% de los lactantes es consecuencia de la pielonefritis y no su causa.

Los síntomas son tanto más inespecíficos cuanto menor es la edad del paciente y con frecuencia la fiebre es la única manifestación de la ITU. Alrededor del 5-8% de los menores de 2 años que presentan fiebre sin focalidad tienen una ITU. Además de la fiebre, pueden presentarse vómitos, rechazo del alimento, dolor

abdominal, irritabilidad o apatía. En neonatos y lactantes se considera que cualquier ITU puede afectar al riñón y evolucionar a una sepsis por lo que, en esta edad, todas las ITU febriles se consideran como pielonefritis.

En pacientes mayores de 2 años, habitualmente niñas, con síntomas miccionales y sin fiebre puede hacerse un diagnóstico de cistitis; sin embargo, entre un 10% y un 20% de estas ITU no pueden catalogarse inequívocamente como altas o bajas, y en la práctica, en muchos casos se tratan como pielonefritis.

La ITU en los dos primeros años de vida o en niños con anomalías del tracto urinario, especialmente reflujo vesicoureteral severo, puede dar lugar a lesiones parenquimatosas irreversibles. Para evitar la aparición de estas lesiones, tradicionalmente se ha realizado profilaxis antibiótica en niños con reflujo vesicoureteral moderado o severo, con uropatías obstructivas y con ITU recurrente; sin embargo, la quimioprofilaxis continuada no ha demostrado ventajas sobre el tratamiento dirigido precoz y la corrección de las anomalías urológicas y, actualmente no se recomienda la administración de profilaxis en este grupo de pacientes.

5.8. INFECCIÓN URINARIA EN EL EMBARAZO

La ITU es la complicación médica más frecuente en el embarazo, clínicamente puede presentarse como cistitis, pielonefritis o BA. Entre 2%-8% de las gestantes, dependiendo del estatus socioeconómico, presentan BA en el primer trimestre y la prevalencia aumenta con la edad y paridad. Sin embargo, el embarazo por sí mismo no parece incrementar la frecuencia de bacteriuria. Aproximadamente 25% de las gestantes con BA desarrollan pielonefritis si no se realiza tratamiento antibiótico, lo que justifica la detección sistemática de BA en embarazadas. La mayoría de los casos de pielonefritis se presentan en el tercer trimestre y el principal factor predisponente es la BA, así la incidencia de pielonefritis aguda está en relación directa con la de BA. Sólo un 2% de las gestantes que desarrollan pielonefritis no tienen antecedentes de BA. Otros factores de riesgo son los antecedentes de ITU antes del embarazo y la diabetes. El cuadro clínico característico se produce al final del embarazo y se manifiesta por fiebre elevada y escalofríos que se acompañan de forma característica de dolor lumbar uni o bilateral, con menor frecuencia aparecen náuseas y vómitos y en ocasiones el cuadro se acompaña de síndrome miccional.

La cistitis se presenta en el 1% de los embarazos, debe considerarse como una ITU primaria, pues no se desarrolla a partir de una BA previa, cursa con la típica sintomatología irritativa, igual que en mujeres no gestantes, y se presenta predominantemente en el segundo trimestre del embarazo.

El manejo de la bacteriuria por *S. agalactiae* en gestantes ha sido clarificado recientemente en un documento del Colegio Americano de Obstetricia y Ginecología (ACOG). En este documento se señala que cualquier recuento de *S. agalactiae* en urocultivo debe ser informado. Todas las gestantes con bacteriuria por *S. agalactiae*, independientemente del número de UFC encontrados en urocultivo, deben recibir profilaxis intraparto como medida de prevención de infección neonatal. Sin embargo, no se recomienda tratamiento antibiótico durante el embarazo si la bacteriuria es inferior a 100.000 UFC/mL. La indicación de tratamiento antibiótico prenatal se limita a las gestantes con bacteriuria asintomática (≥ 100.000 UFC/mL de *S. agalactiae*) o gestantes con cualquier recuento y sintomatología urinaria.

5.9. INFECCIÓN URINARIA EN PACIENTES CON TRASPLANTE RENAL

La infección urinaria es la infección más frecuente en el paciente con trasplante renal, la incidencia es muy variable según las series. En una cohorte española de 867 trasplantados renales, 21% desarrolló una ITU en el primer año post-trasplante. Entre los factores de riesgo de infección se encuentran la diabetes pre-trasplante, la edad avanzada y los antecedentes de ITU de repetición; también, un factor de riesgo importante de ITU en el trasplante renal es el sondaje vesical en el período postrasplante. Las presentaciones clínicas más frecuentes de la ITU son la BA, cistitis y pielonefritis del injerto, y con menor frecuencia se presenta pielonefritis del riñón propio, prostatitis u orquiepididimitis. Se estima que en los 3 primeros años post-trasplante, más de la mitad de los receptores han sufrido una o más ITU, las recurrencias son frecuentes por las alteraciones anatómicas que origina el implante renal.

Actualmente no se recomienda el tratamiento antibiótico de la BA que aparece a partir del primer mes de la cirugía. Sin embargo, no existe evidencia suficiente para hacer recomendaciones a favor o en contra del tratamiento cuando la BA se presenta en el primer mes post-trasplante.

La cistitis aguda se manifiesta con la misma sintomatología irritativa que en pacientes no trasplantados. La pielonefritis aguda del injerto se caracteriza por fiebre y dolor en la región del injerto renal. Su asociación a pérdida del injerto es controvertida, aunque cursa con mayor frecuencia con bacteriemia no se ha demostrado claramente su asociación con rechazo o pérdida de la función renal. Los receptores de un injerto debido a una enfermedad poliquística presentan mayor riesgo de pielonefritis del riñón propio, de forma que algunos autores han propuesto realizar una nefrectomía de los riñones propios previa al trasplante para minimizar la incidencia de complicaciones.

La nefropatía asociada a la infección por el virus BK es una infección característica del trasplante renal. La evolución de la nefropatía es desfavorable, con un 60% de promedio de pérdida del injerto. También, una situación frecuente en el trasplantado renal es la candiduria, cuyos factores de riesgo de aparición son similares al paciente no trasplantado.

5.10. INFECCIÓN URINARIA POR MICOBACTERIAS

La tuberculosis urinaria es la forma más frecuente de tuberculosis extrapulmonar. La infección se produce por diseminación hematógena y se suele presentar años después de la primoinfección. El riñón es el órgano más afectado, *M. tuberculosis* se localiza generalmente en la unión córtico-medular y da lugar a la formación de granulomas, si la infección progresa se origina una papilitis que puede llegar a la necrosis papilar con la formación de cavernas que originan la destrucción del parénquima renal. Generalmente la forma de presentación es unilateral. Las manifestaciones sistémicas son poco frecuentes, aunque puede haber astenia, anorexia y pérdida de peso. Entre los síntomas locales puede presentarse dolor lumbar, hematuria y polaquiuria que no responden al tratamiento antibiótico. En muchas ocasiones el diagnóstico se sospecha por la detección persistente de piuria con urocultivo repetidamente negativo. La afectación vesical se produce por contigüidad y da lugar a una cistitis retráctil y la afectación del uréter puede ocasionar una hidronefrosis. La tuberculosis debe considerarse en el diagnóstico diferencial en varones que presentan orquiepididimitis recurrente de curso subagudo. La infección de la próstata por *M. tuberculosis* es muy infrecuente.

6. INDICACIONES DEL UROCULTIVO

Actualmente no se recomienda la realización sistemática de urocultivo en mujeres con cistitis aguda no complicada, ya que la etiología y el patrón de sensibilidad a antibióticos de los uropatógenos más frecuentes es fácilmente predecible. La recomendación actual es prescribir tratamiento antibiótico empírico, en base a la sintomatología clínica, según el patrón de sensibilidad local de *E. coli*.

Por el contrario, en las ITU complicadas el espectro etiológico es mucho más amplio y los agentes causales presentan con mayor frecuencia resistencia a los antibióticos más habituales, por lo que el urocultivo y el antibiograma de los uropatógenos aislados resultan fundamentales para optimizar el tratamiento. De igual forma, se requiere realizar urocultivo pretratamiento en infecciones no complicadas con sintomatología no clara, en ITU recurrentes, recurrencias precoces que indican un fracaso terapéutico, en pielonefritis aguda y para el diagnóstico de BA en pacientes con factores de riesgo señalados anteriormente. Una vez terminado el tratamiento antibiótico, sólo debe solicitarse un urocultivo si los síntomas persisten o recurren precozmente. En general, no se recomienda realizar urocultivo de control a pacientes que quedan asintomáticos después del tratamiento; una excepción es la BA del embarazo que requiere siempre realizar urocultivo posttratamiento para comprobar la curación. Las principales indicaciones para la realización de urocultivo según la categoría clínica de paciente, así como su posterior manejo están recogidas en la Guía de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) sobre diagnóstico y tratamiento de las infecciones del tracto urinario (2017).

7. OBTENCIÓN, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

7.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Las técnicas de obtención de muestras de orina, salvo la punción suprapúbica, no permiten excluir totalmente la contaminación con bacterias de la uretra distal, lo que puede dar lugar a interpretaciones equívocas de los resultados.

7.1.1. Obtención de muestras de orina de micción media

La orina de micción media o micción espontánea es la muestra más frecuentemente obtenida para diagnóstico microbiológico. Aunque su obtención es fácil, exige una recogida cuidadosa para evitar la contaminación, especialmente en mujeres. Tradicionalmente se ha recomendado el lavado exhaustivo del área genital y perineal antes de la obtención de la muestra, sin embargo, diferentes estudios sugieren que el complicado procedimiento de obtención de muestras por micción media en mujeres puede no ser absolutamente necesario y que el punto realmente importante es la obtención de la muestra sin que la orina tenga contacto con los genitales externos. En este sentido, es fundamental instruir a las pacientes sobre la importancia de mantener separados los labios mayores durante la micción. No obstante, otros autores encuentran menos contaminación en muestras de mujeres que se hacen un lavado y algunas guías siguen recomendando el lavado previo a la recogida de la muestra.

En varones es menos frecuente la contaminación y para una recogida correcta basta generalmente con retraer la piel del prepucio.

Para reducir la contaminación de la orina con bacterias de la microbiota uretral, la primera parte de la micción, más contaminada, debe descartarse recogiendo la micción media en un contenedor estéril. Deben emplearse contenedores de boca ancha que facilitan la recogida.

La concentración de bacterias es mayor en la primera orina de la mañana y aunque no es imprescindible, es el momento óptimo para obtener muestras para cultivo; también, en esta muestra la sensibilidad de la prueba de los nitritos es mayor.

Para el diagnóstico de tuberculosis se requieren 3 muestras recogidas en 3 días consecutivos de la primera orina de la mañana; las muestras deben recogerse con las mismas precauciones que para el urocultivo obteniendo al menos 20-40 mL de orina por cada muestra.

Antes de la obtención de la muestra es necesario informar adecuadamente al paciente del procedimiento a seguir, facilitándole instrucciones simples y precisas que permitan obtener una muestra de calidad que asegure resultados valorables. Los laboratorios deben disponer de hojas de instrucciones para pacientes, donde se detallen los pasos a seguir para obtener correctamente la muestra de orina para urocultivo. Pueden incluirse gráficos o dibujos que facilitan la comprensión.

7.1.2. Obtención de muestras de orina por sondaje vesical

La muestra de orina para cultivo puede también obtenerse directamente de la vejiga por sondaje vesical, evitando la posible contaminación con la microbiota uretral. Sin embargo, con el sondaje vesical es posible la introducción de microorganismos en la vejiga produciendo una ITU iatrogénica. El sondaje sólo se considera indicado cuando no es posible obtener muestra por micción media, como es el caso de pacientes inmovilizados, obesos, con alteraciones neurológicas y en niños sin control de esfínteres.

7.1.3. Obtención de muestras de orina en pacientes con sondaje permanente

Por norma general en los pacientes con sonda permanente y con sospecha de ITU la orina se debe recoger

tras el cambio de sonda. Las muestras obtenidas a través de sondas colocadas por un periodo prolongado de tiempo (≥ 2 semanas) están contaminadas con bacterias de la biopelícula por lo que en la orina se encuentran un mayor número de bacterias y en mayores recuentos en comparación con la orina obtenida a través de la nueva sonda.

En algunos casos, cuando no se puede proceder de inmediato al recambio de sonda permanente, la recogida de orina para cultivo se realiza pinzando la sonda para poder obtener orina recién emitida. Después de pinzar la sonda es necesario desinfectar, con una gasa humedecida en alcohol o con solución de clorhexidina, la superficie de la sonda donde se va a hacer la punción. Transcurrido el tiempo necesario para la actuación del desinfectante, se punciona con aguja y jeringa estéril en la zona desinfectada para aspirar la muestra. Deben obtenerse entre 5 y 10 mL de orina y transferirlos a un contenedor estéril para su transporte. Algunas sondas tienen un dispositivo específico para obtener muestras; en este caso, para obtener orina recién emitida, debe pinzarse la sonda y después abrir el dispositivo para eliminar la orina acumulada. Al cabo de 40-60 minutos puede retirarse la pinza y obtener la muestra volviendo a abrir el dispositivo. No obstante, el resultado de urocultivo debe valorarse con cautela.

Nunca debe obtenerse una muestra de orina a partir de la bolsa colectora; tampoco, se debe desconectar la sonda de la bolsa para la recogida de la muestra, ya que la apertura del sistema aumenta el riesgo de infección.

La punta de la sonda no es una muestra adecuada para diagnóstico de ITU y no debe procesarse.

7.1.4. Obtención de muestras de orina en niños mediante bolsas colectoras

En niños pequeños sin control de esfínteres, es práctico el empleo de bolsas colectoras que se aplican con un adhesivo después de lavar el área perineal y genital. Sin embargo, es muy frecuente la contaminación y aun aplicándolas correctamente sólo se obtienen resultados valorables en el 50-60% de los casos. Cuando la micción no se produce en una hora es necesario repetir el lavado y colocar una nueva bolsa. Una vez recogida la orina, la bolsa cerrada debe introducirse en un contenedor estéril de boca ancha y cierre a rosca. También, se puede verter el contenido de la bolsa a un contenedor estéril, evitando que la orina entre en contacto con la zona de la bolsa que ha estado adherida a la piel.

Para muchos autores, los resultados del cultivo de muestras obtenidas con esta técnica sólo tienen valor para descartar ITU cuando el cultivo resulta negativo. Los cultivos positivos son de difícil interpretación (valor predictivo positivo de tan solo 15%) y deben confirmarse con una nueva muestra obtenida por sondaje vesical o punción suprapúbica.

7.1.5. Obtención de muestra de orina por punción suprapúbica

La punción-aspiración suprapúbica permite obtener orina directamente de la vejiga a través de la pared vesical y es la técnica de elección en pacientes en los que no es posible obtener orina libre de contaminantes. Resulta especialmente útil y fácil de realizar en niños y suele realizarse bajo control ecográfico. Estas muestras están exentas de contaminación y cualquier hallazgo microbiológico debe considerarse significativo; generalmente, cuando hay una ITU se encuentran recuentos bacterianos de $\geq 10^3$ UFC/mL. En ocasiones, la orina aspirada puede contaminarse por reflujo con microorganismos de la microbiota uretral y pueden encontrarse recuentos bajos de bacterias en ausencia de ITU. Es la única muestra válida para el cultivo de bacterias anaerobias en el caso de sospecha clínica.

7.1.6. Obtención de muestras de orina de nefrostomía

La nefrostomía permite el drenaje de orina directamente del riñón al exterior a través de un catéter introducido en la pelvis renal que drena a una bolsa colectora. Si la orina se recoge durante el acto quirúrgico de la nefrostomía, se trata de una orina libre de contaminación y cualquier resultado debe considerarse significativo.

En pacientes que tienen ya una nefrostomía, cuando existe sospecha de infección, debe cambiarse el catéter y obtener la muestra de orina por aspiración desde el nuevo catéter.

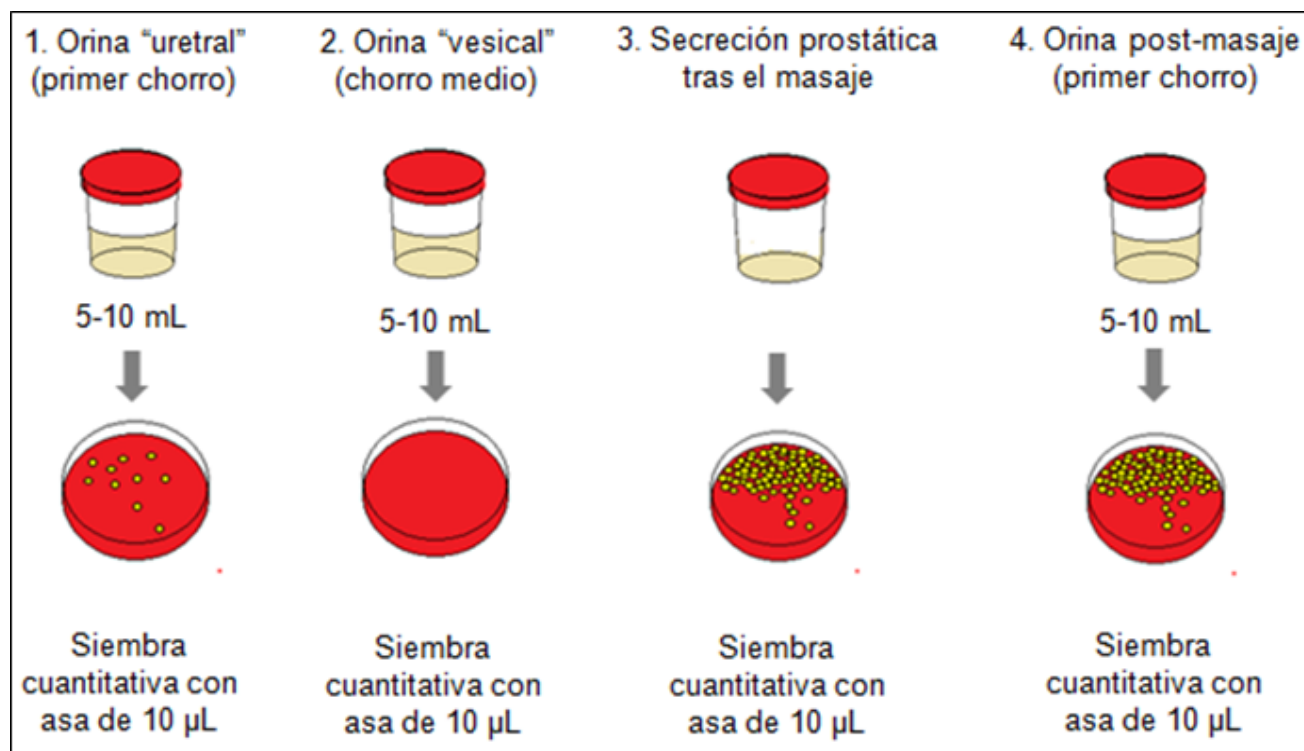
En ocasiones no se sustituye el catéter y la orina se obtiene por aspiración, después de retirar la bolsa y desinfectar la zona del estoma; en este caso, los resultados obtenidos del procesamiento de la muestra son de muy dudoso valor.

7.1.7 Obtención de muestra para el diagnóstico de prostatitis crónica

El diagnóstico de la prostatitis crónica es difícil y el porcentaje de casos confirmados por cultivo es mucho más bajo que en la prostatitis aguda. El método tradicional de Meares-Stamey permite el diagnóstico microbiológico realizando cultivos cuantitativos comparativos de diferentes fracciones de la orina y de la secreción prostática o semen, con el fin de establecer si la infección está localizada en la vejiga o en la próstata. La prueba requiere la obtención de 4 muestras (Figura 1):

- **Muestra 1**, "orina uretral", se recogen 5-10 mL de la primera parte de la micción, que traduce los microorganismos presentes en la uretra distal;
- **Muestra 2**, "orina vesical", en otro contenedor se recogen 5-10 mL de orina de micción media, que refleja los microorganismos presentes en la vejiga;
- **Muestra 3**, secreción prostática, la muestra se obtiene tras la realización de un masaje prostático por vía transrectal, donde los microorganismos presentes serán de origen prostático;
- **Muestra 4**, "orina post-masaje", se recogen 5-10 mL de orina después de realizar el masaje prostático.

Figura 1. Técnica de Meares-Stamey para obtención de muestras para diagnóstico de prostatitis crónica.



La muestra de secreción prostática puede sustituirse por una muestra de semen obtenido por el propio paciente. El cultivo de semen como muestra aislada carece de valor diagnóstico y sólo debe procesarse si va acompañado de las distintas fracciones de orina.

El método simplificado de Nickel consiste en obtener dos muestras de orina, una orina pre-masaje y otra después de un masaje prostático. Este método demuestra resultados concordantes con el de Meares-Stamey y puede ser una alternativa válida cuando no se puede obtener secreción prostática.

Todas las muestras deben recogerse en contenedores estériles sin conservante y deben enviarse al laboratorio en el menor tiempo posible. Además de cultivo cuantitativo debe realizarse detección de *C. trachomatis* y *M. genitalium*. Debe indicarse en cada uno de los contenedores claramente a que fracción de orina pertenece cada muestra.

Se considera que existe una prostatitis cuando el recuento de bacterias es diez veces superior en la secreción prostática, semen u orina post-masaje que en la muestra de orina uretral o vesical (Figura 1). Asimismo, cuando se realiza recuento de leucocitos, en las distintas fracciones, se encuentran valores más elevados en la muestra post-masaje o de semen.

La detección de *C. trachomatis* y *M. genitalium* debe realizarse preferiblemente en la orina uretral y orina post-masaje. El diagnóstico de prostatitis sólo puede confirmarse si estos patógenos se detectan únicamente en la orina post-masaje. Cuando se detectan en las dos muestras, puede tratarse de una uretritis o una prostatitis y para realizar el diagnóstico de localización hay que valorar, junto con los resultados microbiológicos, los datos clínicos, analíticos y el resultado del tacto rectal y las técnicas de imagen.

7.2. VOLUMEN MÍNIMO DE LA MUESTRA SEGÚN EL ESTUDIO SOLICITADO

En la [Tabla 2](#) se presentan los volúmenes de orina requeridos para las determinaciones más frecuentemente solicitadas, así como las condiciones de transporte y conservación. Si además del cultivo se realiza el examen de sedimento urinario centrifugado, el volumen mínimo recomendado es de 10 mL.

Tabla 2. Volúmen de orina requerido según determinación

Determinación	Volumen orina	Comentario
Urocultivo	5-10 mL	Contenedor con conservante para el transporte. Se puede usar contenedor sin conservante si el transporte se demora ≤ 2 h. La muestra óptima es la primera orina de la mañana. Se puede conservar refrigerada (2-8°C) ≤ 24 h antes de su procesamiento.
Cultivo de micobacterias	20-40 mL (x3)	Contenedor sin conservante. Obtener 3 muestras en 3 días consecutivos (20-40 mL de orina por muestra). La muestra óptima es la primera orina de la mañana. Se puede conservar refrigerada (2-8°C) ≤ 24 h antes de su procesamiento.
Anaerobios	5-10 mL	Sólo en orina de punción suprapúbica. Contenedor específico para anaerobios.
Detección de antígenos	5-10 mL	Antígenos de <i>Legionella</i> y neumococo. Contenedor estéril con o sin conservante. Se puede conservar a temperatura ambiente ≤ 24 h o refrigerada (2-8°C) hasta 14 días. Alternativamente las muestras se pueden congelar (-20°C).
Parásitos (esquistosomiasis)	100 mL Orina 24h	Recoger la muestra de orina después de mediodía (entre las 12h y las 15h) o recoger orina de 24h. Es recomendable realizar ejercicio previo a la recogida de muestra para aumentar la eliminación de huevos. Contenedor estéril sin conservante o contenedor orina 24h.
Virus (CMV, BK, adenovirus, etc.)	5-10 mL	Indicado en recién nacidos (CMV), trasplantados (BK), cistitis hemorrágica niños (adenovirus), o como muestra adicional para el diagnóstico por biología molecular de infecciones víricas sistémicas. Contenedor estéril sin conservante o con medio de transporte de virus. La muestra se conserva refrigerada (2-8°C) antes de su procesamiento.
Detección de leptospiras	5-10 mL	Sólo es válida la orina recién emitida para observación en campo oscuro. Contenedor sin conservante. Las leptospiras son sensibles a la acidez de la orina, por lo tanto, el cultivo debe realizarse durante las primeras 2 horas después de su recogida.

7.3 TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN

Una vez obtenida la muestra de orina, el transporte al laboratorio debe realizarse en el plazo de tiempo más breve posible ya que, tras 2 horas a temperatura ambiente, la multiplicación de microorganismos en la muestra puede dar lugar a resultados microbiológicos erróneos. Si el transporte o procesamiento no pueden realizarse inmediatamente es necesario refrigerar las muestras entre 2-8°C, esta temperatura permite la conservación de las muestras durante unas 24 horas.

El método de recogida más utilizado para evitar el sobrecrecimiento bacteriano en la muestra es el empleo de contenedores que contienen antisépticos débiles como el ácido bórico-formiato de sodio, que es el más empleado. Existen unos sistemas de recogida de orina comercializados que incluyen un contenedor estéril de boca ancha donde se recoge la muestra y en los que la tapa del contenedor lleva un dispositivo que permite llenar un tubo de vacío con el conservante. Aunque el volumen adecuado son 5-10 ml, deben recogerse al menos 3 mL de orina para evitar el efecto inhibitorio del conservante. Aparte del efecto bacteriostático, el ácido bórico puede prevenir la destrucción de leucocitos durante el transporte y conservación de la muestra de orina, aunque hay estudios con resultados que no lo confirman. Los contenedores con conservante no son válidos para cultivo de micobacterias ni para la detección de virus o parásitos.

Aunque la mayoría de los laboratorios clínicos utilizan contenedores con ácido bórico como conservante, su empleo es un tema controvertido. Numerosos autores han evaluado el efecto inhibitorio del ácido bórico sobre los uropatógenos más frecuentes y la mayoría de los estudios no encuentra diferencias significativas en los resultados obtenidos en el cultivo de muestras conservadas con ácido bórico, procesadas inmediatamente tras su obtención o refrigeradas a 4°C durante 24 h. Sin embargo, un reciente metaanálisis concluye que el nivel de evidencia de muchos de los estudios publicados es bajo y de sus resultados no puede derivarse una recomendación a favor o en contra del uso de ácido bórico como conservante de muestras de orina.

8. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA EN EL LABORATORIO

El estudio microbiológico de la orina debe incluir, junto con el urocultivo, la detección de leucocituria que proporciona información complementaria muy valiosa para interpretar correctamente los resultados del cultivo. Se han desarrollado diferentes técnicas rápidas que permiten, mediante la detección de leucocituria y/o bacteriuria, realizar un diagnóstico presuntivo de ITU antes de disponer de los resultados del cultivo. Además, estas técnicas pueden utilizarse como cribado para seleccionar las orinas positivas para cultivo.

8.1 TÉCNICAS PARA DETECCIÓN DE LEUCOCITURIA Y/O BACTERIURIA

8.1.1 Tira reactiva

La tira de orina se puede realizar individualmente, con lectura manual, semiautomatizada o completamente automatizada. Los principales parámetros que tienen interés para el diagnóstico de la infección son los siguientes:

1. Nitritos. Muchos microorganismos causantes de ITU, principalmente *Enterobacterales*, son capaces de metabolizar los nitratos a nitritos. La presencia de nitritos en la orina es muy específica de presencia de infección urinaria (especificidad de 85-98%), aunque su sensibilidad es, por diversas razones, limitada (45-60%). Una es que hay microorganismos que no poseen esta propiedad (*Enterococcus* spp.), y hay otros que, aunque reducen los nitratos a nitritos, también metabolizan los nitritos a gas (*P. aeruginosa*), por lo que estos últimos no se suelen detectar. Por otra parte, el tratamiento antibiótico puede inhibir el metabolismo de las bacterias y, por consiguiente, su capacidad enzimática. Entre otras causas de falsos negativos se puede citar: las orinas que hayan sido retenidas durante poco tiempo en la vejiga (menos de 4 h), con lo que los microorganismos no han tenido tiempo de expresar su metabolismo, o recuentos bacterianos bajos (<10⁴ UFC/mL), la orina diluida, la degradación de nitritos en las muestras que se almacenan a temperatura ambiente durante más de 4 h, o la presencia de altos niveles del ácido ascórbico. Como causas de falsos positivos se encuen-

tran: tiras incorrectamente almacenadas (la exposición al aire prolongada), medicamentos que colorean la orina (fenazopiridina), o muestras mal conservadas antes de la realización de la prueba (multiplicación de microorganismos contaminantes).

2. Esterasa leucocitaria. Es un enzima presente en los granulocitos y sirve como un marcador subrogado de recuento de leucocitos. La tira contiene éster de indoxil, que se lisa en presencia de la esterasa leucocitaria, después reacciona con una sal de diazonio y resulta en un compuesto de color violeta. La ventaja es la capacidad de detectar en la orina tanto esterases provenientes de leucocitos intactos como esterases libres presentes después de la lisis celular. Por ello pueden observarse resultados discordantes entre los recuentos de leucocitos observados en el sedimento tras la centrifugación y recuentos estimados por la tira reactiva. Los principales inconvenientes son los resultados falsos positivos y negativos. Entre las causas de resultados falsos positivos se puede citar las tiras no conservadas correctamente, contaminación por flujo vaginal, tratamiento con imipenem, meropenem o ácido clavulánico. Causas de falsos negativos son: muestras mal homogeneizadas o no atemperadas antes del análisis, proteinuria de más de 500 mg/dL, glucosuria de más de 2.000 mg/dL, altos niveles del ácido ascórbico (tiras reactivas de algunas marcas comerciales), tratamiento con cefalexina, nitrofurantoína, gentamicina o tetraciclinas. Las bacterias, *Trichomonas* spp. y hematíes no afectan la reacción de manera significativa. Hay que tener en cuenta que la estabilidad del enzima en las muestras de orina es de 1-4 h a temperatura ambiente. La sensibilidad de la prueba de esterasa leucocitaria es baja (48-86%) igual que la especificidad, que varía entre el 17% y el 93% en distintos estudios.

3. Detección de hemoglobina. En realidad, la prueba detecta hematíes, hemoglobina (hematíes lisados) y mioglobina. Se basa en la propiedad de la hemoglobina y de la mioglobina de catalizar la reacción oxidativa de la tetrametilbencidina en presencia de 2,5-dimetilhexano-2,5-dimetilperóxido para dar lugar a un color verde azulado que, combinado con el amarillo de la propia tira, se convierte en color verde. La detección de hemoglobina sirve de marcador subrogado de hematuria, cuya presencia debe tomarse en consideración en determinadas infecciones (infecciones causadas por *Proteus* spp. que se asocian con la formación de cálculos renales). Las principales causas de resultados falsos positivos son: tiras almacenadas de manera inadecuada y contaminación menstrual. El exceso de nitritos puede causar los resultados falsamente negativos. Existen otras diversas patologías que pueden ocasionar hematuria en ausencia de infección.

Aunque el pH elevado de la orina puede indicar una infección por microorganismos que degradan la urea, como *Proteus* spp. o *Corynebacterium urealyticum*, es un parámetro que presenta muy baja especificidad debido a que se altera por muchas otras causas, incluida la dieta.

8.1.2 Examen microscópico

8.1.2.1 Examen de orina sin teñir

Se puede examinar la orina sin centrifugar en cámaras de Fuchs-Rosenthal o Neubauer (no desechables) o Kova (desechable). En muchos laboratorios se prefiere el examen en orina centrifugada, por ser más cómodo, aunque el proceso de centrifugación puede alterar ligeramente algunos elementos morfológicos y es más difícil de estandarizar. La preparación de la muestra para el examen de sedimento sin teñir y la expresión de los resultados se describen en el PNT-UR-01 de este procedimiento. Durante el examen se evalúan y se cuantifican (por campo, por μL o por mm^3) los siguientes elementos:

1. Células de epitelio escamoso. Se distinguen por su aspecto de gran tamaño (más de 8 veces el de un leucocito). En las muestras provenientes de mujeres y recogidas por micción, su abundancia puede indicar contaminación de la muestra. En general, las orinas con muchas de estas células no son adecuadas para el estudio microbiológico y se debe solicitar una nueva muestra. No obstante, este tipo de células también pueden provenir del trigono vesical, en el que se haya producido una metaplasia escamosa, especialmente en mujeres con cervico-trigonitis o en pacientes con otras alteraciones (neoplasias, uretritis en varón, sondaje permanente).

2. Hematíes. Se define la microhematuria como la presencia de más de 3 hematíes por campo de 400 aumentos. Los hematíes en la orina pueden provenir de una enfermedad renal o de una patología urológica, entre ellas, la infección urinaria. En el segundo caso, su aspecto es el mismo que el de los hematíes de la sangre.

3. Leucocitos. Los recuentos de leucocitos que se correlacionan con la ITU varían según estudios. El método de referencia para la cuantificación de la piuria es la medida de la tasa de excreción leucocitaria que requiere la orina de 24 h. El recuento de 10 leucocitos/mm³ en las cámaras de cuantaglóbulos ha demostrado buena correlación con bacteriuria significativa (≥ 100.000 UFC/mL). En cuanto a la orina centrifugada, faltan estudios que correlacionan los recuentos de leucocitos con resultados de cultivos cuantitativos y distintas presentaciones de ITU, pero suelen ser los recuentos a partir de 5-10 leucocitos/HPF (*high power field*). La presencia de cilindros leucocitarios y, especialmente, bacterianos o mixtos es indicativa de pielonefritis.

8.1.2.2 Tinción de Gram

La tinción de Gram de orina sin centrifugar, aparte de la información sobre la presencia de las células de descamación y leucocitos, tiene ventaja de detectar distintos morfotipos de microorganismos. Es una técnica que puede ser usada como cribado para selección de orinas positivas, si se requiere la aplicación de las técnicas rápidas de diagnóstico. La observación de aproximadamente una bacteria por campo de 1000x corresponde a los recuentos de $\geq 10^5$ UFC/mL. Aunque es una técnica relativamente laboriosa y debido al gran número de orinas que se reciben no puede ser aplicada a todas las muestras en muchos laboratorios, aplicándose a los casos seleccionados, permite un diagnóstico orientativo de microorganismo causante de ITU y puede ayudar a dirigir el tratamiento empírico, sobre todo en urosepsis y en niños de corta edad. Según algunos estudios, en los niños menores de 6 meses la detección de microorganismos junto con piuria puede tener un valor predictivo positivo de 85% para el diagnóstico de ITU. En algunos casos la tinción de Gram ayuda a detectar presencia de microorganismos exigentes que requieren medios o condiciones de incubación especiales. La observación de microorganismos intraleucocitarios es indicativa de la infección.

8.1.3 Sistemas automáticos

La gran cantidad de muestras de orina que llegan a los laboratorios ha creado la necesidad de automatización de su análisis. El objetivo es doble: por una parte, proporcionar unos parámetros adicionales para una evaluación más completa de la muestra y, en segundo lugar, para identificar las orinas presuntamente negativas para no cultivarlas.

8.1.3.1 Sistemas automáticos de microscopía de orina

Recientemente se han desarrollado diversos sistemas que, gracias a programas informáticos de reconocimiento de imágenes, son capaces de distinguir la mayoría de los elementos formes de la orina. Desde el punto de vista microbiológico, lo que interesa de estos sistemas es su capacidad de distinguir los principales elementos descritos anteriormente: células de descamación epitelial del epitelio pavimentoso estratificado, leucocitos, hematíes, bacterias, levaduras, cilindros bacterianos y/o leucocitarios.

Los sistemas sediMAX (Menarini Diagnostics), COBAS (Roche) o Atellica (Siemens) funcionan de manera parecida, aunque pueden variar ligeramente las características técnicas y de rendimiento. Como ejemplo, el equipo de COBAS pipetea 170 μ L de muestra, después de homogeneizarla, la deposita en una cubeta prismática apaisada. Una ligera centrifugación (260 x g durante 10 segundos) permite desplazar los elementos formes en el mismo plano, para obtener unas buenas fotografías. Se obtienen 20 y el sistema analiza las 15 mejores. Puede trabajar a un ritmo de 116 orinas a la hora. Las formas detectadas son: leucocitos, hematíes, bacterias, células escamosas, células no escamosas, cilindros patológicos, cilindros no patológicos, levaduras, moco, cristales y esperma. Las imágenes se revisan por el operador, que tiene la posibilidad de corregir fácilmente las partículas erróneamente clasificadas y las no detectadas. El equipo puede conectarse a un sistema automático de tiras reactivas, previo al análisis por microscopía automatizada.

El sistema IRIS (Iris Diagnostics) puede analizar entre 40 y 101 muestras a la hora, dependiendo del modelo. El sistema de reconocimiento de imagen permite clasificar las partículas en 12 tipos y 27 subtipos. La orina no centrifugada pasa en forma de flujo laminar y un sistema de vídeo capta 500 imágenes de las partículas presentes. Un sistema de inteligencia artificial clasifica las partículas en función de su forma, tamaño, textura y contraste en hematíes, leucocitos, acúmulos de leucocitos, células escamosas, células no escamosas, cilindros hialinos, cilindros no hialinos, bacterias, cristales, levaduras, esperma, moco y artefactos. El operador puede reclasificar las partículas.

8.1.3.2 Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica que permite obtener información sobre las poblaciones celulares presentes en la muestra y que permite las mediciones cuantitativas (por microlitro). Esta técnica es capaz de analizar 130.000 partículas de la muestra de orina sin centrifugar en 5 segundos. El sistema aplica dos fluorocromos, uno que tiñe las membranas y proteínas y el otro los ácidos nucleicos. Se aplica una luz láser que pasa a través de cada partícula, y los rayos de luz transmitida y dispersada son analizados, de manera que, para cada elemento, el sistema analiza la intensidad, la cantidad, la frecuencia de la luz, así como la luz polarizada. El sistema asociado dibuja unas gráficas (escatergramas) con las que se pueden identificar las diferentes partículas. El sistema está validado para informar leucocitos y sus agregados, hematíes totales y lisados, bacterias, levaduras, cilindros (hialinos y patológicos), células escamosas, células transicionales, células tubulares renales, cristales, esperma y moco. Además, tiene parámetros de investigación. El citómetro UF1000 de Sysmex puede analizar 105 muestras por hora. La última versión del equipo de Sysmex incorpora de manera opcional un sistema de reconocimiento de imágenes (módulo UD). El programa de análisis de datos las clasifica en diferentes tipos, que pueden ser revisados por el operador.

8.1.4 Evaluación de las técnicas empleadas para el cribado de orinas

Antes de decidir qué método usar para el cribado de orinas, hay que contestar la pregunta de cuál es el objetivo para cribar las muestras. Los dos objetivos principales suelen ser el disminuir la carga de trabajo del personal técnico y facultativo y ahorrar los costes. Actualmente para cribar las orinas se pueden usar 3 estrategias:

1. Cribado por microscopía manual o automatizada y tira reactiva.
2. Cribado por citometría de flujo, y
3. Cribado con cultivo en medio líquido (sistemas de HBL y Alfred). La última estrategia se explicará en el apartado 8.3 de este procedimiento.

A. Cribado por leucocituria. El principal parámetro que se usa es la leucocituria, a veces en combinación con otros parámetros (sobre todo, nitritos). El punto principal que apoya esta estrategia es que hay estudios que correlacionan la leucocituria (≥ 10 leucocitos/ mm^3 o 5-10/campo) con bacteriuria significativa (≥ 100.000 UFC/mL). Pero esta estrategia tiene una serie de limitaciones importantes:

- La presencia de leucocitos no siempre indica la infección, por lo tanto, es un indicador indirecto de ITU.
- Hay que tener en cuenta que leucocituria puede o no acompañar BA. Este hecho tendría repercusión para los casos en que está indicado detectar BA, pero también puede llevar los tratamientos innecesarios de BA acompañada por leucocituria.
- Se ha demostrado que incluso con las condiciones correctas de transporte y conservación de muestra cada hora de retraso en el procesamiento de la orina supone unas pérdidas en los recuentos de leucocitos. Además, la centrifugación de la muestra para obtener el sedimento también puede contribuir a la destrucción de una parte de células, sobre todo si no se respeta el tiempo y las revoluciones recomendados (ver el PNT-UR-01 de este procedimiento).

- La correlación entre los recuentos de leucocitos y bacterias se han hecho sobre todo con las bacteriurias de más de 100.000 UFC/mL, por lo tanto, no se sabe la sensibilidad de esta técnica de cribado en el caso de recuentos menores. Es un punto importante, ya que la mayoría de las muestras a los que se aplican las técnicas de cribado suelen ser ITU comunitarias y de estas la gran proporción son las muestras de mujeres con cistitis, que como sabemos pueden tener los recuentos tan bajos como 100 UFC/mL.
- Hay condiciones especiales, como pacientes con agranulocitosis, donde este criterio no se puede usar.
- En el caso del sedimento centrifugado, al ser una técnica poco estandarizada, los recuentos de leucocitos que se obtienen en orina tras centrifugación pueden variar significativamente.

La tinción de Gram puede solucionar alguna de las limitaciones de la técnica anterior, permitiendo visualizar las bacterias presentes en la orina, detectar muestras potencialmente contaminadas (*Lactobacillus* spp., “clue-cells”, varios morfotipos de bacterias). Pero este método tampoco está exento de limitaciones: requiere tiempo, necesita una experiencia por parte de la persona que valora la tinción y solo detecta microorganismos cuando están presentes en recuentos $\geq 10^4$ - 10^5 UFC/mL.

B. Cribado por bacteriuria con/sin leucocituria mediante la citometría de flujo. Para el cribado se usa el recuento de bacterias/ μ L con o sin el recuento de leucocitos/ μ L. Esta técnica tiene la principal ventaja de usar el parámetro directo de detección de microorganismos y además cuantificar su presencia en la muestra. Además, en las orinas con recuentos altos y cultivo negativo la citometría ayuda a detectar los microorganismos exigentes que requieren medios no selectivos o especiales, o tiempos de incubación más prolongados. Una posible estrategia en el procesamiento de estas muestras es realizar identificación directa mediante MALDI-TOF. Las principales limitaciones de la citometría son las siguientes:

- Cada centro debe establecer los puntos de corte propios para cada población de pacientes en función fundamentalmente del género, la edad del paciente y el tipo de ITU.
- La mayoría de los estudios de cribado por citometría buscan un punto de corte para detectar recuentos de ≥ 10.000 UFC/mL. Faltan datos para las muestras con recuentos de < 10.000 UFC/mL.
- Los citómetros suelen tener avisos sobre presencia de morfología bacilar o cocoide, o, con el nuevo programa informático, sobre presencia de Gram-positivos y Gram-negativos. Suelen tener una buena correlación con el cultivo para los bacilos Gram-negativos. En cuanto a la detección de microorganismos Gram-positivos, algunos trabajos apuntan a que podría ser de utilidad solamente en orinas con recuentos de más de 1.000.000 UFC/mL.
- La detección de levaduras no siempre es fiable por la superposición de escatergramas de éstas últimas con hematíes, especialmente con los hematíes dismórficos.

Hay que remarcar que los puntos de corte para el cribado dependerán no solo de las características de pacientes, sino de la sensibilidad que se busca y de la tasa de falsos negativos que se considera aceptable.

En la [Tabla 3](#) se citan algunos estudios en los que se han determinado los puntos de corte de bacterias y leucocitos para selección de muestras positivas.

Tabla 3. Puntos de corte encontrados en distintos estudios para reducir la siembra de muestras de orina.

Estudio	Número de muestras	Mujeres (%); muestras hospitalarias (%)	Criterio(s) de positividad del cultivo	Punto(s) de corte de recuento de bacterias y leucocitos	Sensibilidad (%); reducción de siembra (%)
Pierretti <i>et al.</i> 2010	703	70%; 18,2%	$\geq 10^4$ UFC/mL	65 bacterias/ μ L y 100 leucocitos/ μ L	98%; 43%
Jolkonnen <i>et al.</i> 2010	1.094	64,7%	<i>Finnish national guidelines</i> (dependiendo de tipo de paciente y recogida de la muestra)	Global: 405 bacterias/ μ L y 16 leucos/ μ L Varones adultos: 40 bacterias/ μ L y 17 leucocitos/ μ L Mujeres adultas: 630 bacterias/ μ L y 10 leucocitos/ μ L Niños (<16 años): 40 bacterias/ μ L y 17 leucocitos/ μ L	97% (global); 64,5% 96,8% (hombre); 72,1% 96% (mujer); 60,5% 97% (niños); 70,3%
Broeren <i>et al.</i> 2011	1.577	62%; 56,8%	1. No crecimiento 2. $\geq 10^4$ UFC/mL 3. $\geq 10^5$ UFC/mL	26 bacterias/ μ L con el criterio 1 39 bacterias/ μ L con el criterio 2 230 bacterias/ μ L con el criterio 3	95%; 20% (criterio 1) 95%; 28% (criterio 2) 95%; 52% (criterio 3)
Martín Gutiérrez <i>et al.</i> 2015	346	43%; 0%	1. $\geq 10^4$ UFC/mL hombres 2. $\geq 10^5$ UFC/mL mujeres	≥ 200 bacterias/ μ L	99,1%; 60,2%
Íñigo M <i>et al.</i> 2016	1.934	60,8%; 51,2%	$\geq 10^2$ UFC/mL con clínica de ITU	460 bacterias/ μ L y 40 leucocitos/ μ L	98,1%; 57,2%
Geerts <i>et al.</i> 2016*	7.322	56%; 40%	1. $\geq 10^5$ UFC/mL 2. Cualquier recuento siempre que el cultivo se valoró como positivo y se realizó antibiograma.	200 bacterias/ μ L con el criterio 1 200 bacterias/ μ L con el criterio 2 (mujer) 400 bacterias/ μ L con el criterio 2 (varones)	96,9%; 49% (criterio 1) 93,5%; 34% (criterio 2 mujer) 86,4%; 71% (criterio 2 hombre)
Monsen <i>et al.</i> 2017	1.312	68,3%; 79,4%	<i>European Guidelines</i> (dependiendo de tipo de paciente y recogida de la muestra)	No hay un punto de corte fijo, sino que se ha usado LDA (análisis discriminante lineal) para la combinación de bacterias y leucocitos	95%; 42%

*En este estudio se ha buscado un punto de corte que corresponde al valor predictivo negativo de $\geq 95\%$

En resumen, no hay ningún sistema infalible que sea capaz de tener una sensibilidad y especificidad del 100%. La citometría de flujo parece el método más adecuado, pero faltan estudios que se centren en las muestras obtenidas por métodos distintos a la micción espontánea (sondaje, sonda permanente, nefrostomías, punción suprapúbica), en niños menores de 5 años, en las muestras con recuentos bajos, etc. Este tipo de muestras no se deben someter al cribado.

8.2 UROCULTIVO

8.2.1 Medios de cultivo

El cultivo sigue siendo el patrón de oro del diagnóstico microbiológico de ITU. Permite aislar los microorganismos causantes y realizar el estudio de sensibilidad para dirigir el tratamiento. No existe una norma general sobre el medio de cultivo que hay que usar para cultivar la orina. Los medios y sus combinaciones más frecuentemente utilizados son los siguientes: CLED solo, CLED y agar sangre, MacConkey y agar sangre,

un medio cromogénico solo o junto con agar sangre. A la hora de escoger los medios de cultivo a usar, hay que tener en cuenta las limitaciones de cada uno. Así, el medio de agar sangre permite la recuperación no solo de los patógenos habituales (*Enterobacteriales*, *P. aeruginosa*, *enterococos*, *estafilococos*, *S. agalactiae* y levaduras), sino también los microorganismos más exigentes que no crecerían o crecerían con dificultad en los medios selectivos y diferenciales, tales como *C. urealyticum*, *A. schaalii*, *Aerococcus* spp., algunos estreptococos, etc. Por otra parte, este medio no permite diferenciar bien entre distintos morfotipos de bacilos Gram-negativos. El agar MacConkey permite realizar la diferenciación entre los bacilos fermentadores y no fermentadores de lactosa. El medio CLED (*Cysteine lactose electrolyte deficient*) permite recuperar los microorganismos más frecuentes que causan infección urinaria. En este medio la capacidad invasora de la mayoría de las cepas de *P. mirabilis* se anula, lo que facilita la recuperación de microorganismos en los cultivos polimicrobianos. Se recuperan bien todas las Enterobacteriales, los bacilos Gram-negativos no fermentadores, así como enterococos, estafilococos y la mayoría de las cepas de *S. agalactiae*, pero los microorganismos más exigentes no suelen crecer en este medio. Los medios cromogénicos específicos para infecciones urinarias son selectivos y diferenciales y, gracias a algunas reacciones bioquímicas, permiten una mejor diferenciación de las colonias. La mayoría incorporan sustratos que permiten visualizar las reacciones de la β -galactosidasa (positiva en *E. coli* pero también en otras muchas enterobacterias) o de la β -glucuronidasa (positiva en 85-96% de *E. coli*, en 44-58% de *Shigella*, 20-29% de *Salmonella* y en *Yersinia* spp.), β -glucosidasa (positiva en los géneros de *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* y en enterococos) y triptófano-desaminasa (positiva en los géneros de *Proteus*, *Morganella* y *Providencia*). La probabilidad de que una colonia de un bacilo Gram-negativo color rosado en un medio cromogénico que utilice β -glucuronidasa como marcador sea de la especie *E. coli* supera el 99%. En los medios que usan β -galactosidasa en lugar de β -glucuronidasa es necesario aplicar la prueba del indol (positiva en la mayoría de las cepas de *E. coli*) para obtener una probabilidad parecida.

Hay que tener en cuenta que en los casos seleccionados puede ser necesario usar algún medio de cultivo especial para asegurar la recuperación de uropatógenos determinados, por ejemplo, el agar sangre con base Schaedler para recuperar anaerobios en orina recogida por punción suprapúbica en pacientes con sospecha clínica, o agar chocolate en los niños menores de cinco años para aislar *Haemophilus influenzae*. En casos muy especiales, si se sospecha ITU por microorganismos Gram-positivos puede emplearse adicionalmente el medio CNA (agar sangre con colistina y ácido nalidíxico).

En ciertas circunstancias se han usado los laminocultivos. Se trata de diferentes medios de cultivo (dos o tres, en general CLED, MacConkey y algún otro) incorporados a una lámina de plástico pegada al tapón de rosca de un recipiente de unos 30 mL. Se vierte la orina en el recipiente, se sumerge el medio en él y se desecha la orina. Tiene la ventaja de ser un método que permite una siembra que puede ser realizada por el personal no cualificado fuera del laboratorio, pero tiene una serie de desventajas, tales como los recuentos inexactos, dificultad para diferenciar cultivos mixtos, incorrecta inoculación del medio que conlleva los resultados no interpretables.

8.2.2 Siembra

La siembra de orina se realiza de manera cuantitativa y para ello se usan asas calibradas de 1 μ L o de 10 μ L. Si se siembran 10 μ L una colonia aislada corresponde al recuento de 100 UFC/mL, mientras que si se usa el asa de 1 μ L una colonia corresponde al recuento de 1.000 UFC/mL.

Es importante realizar la técnica de siembra de manera correcta y homogénea para disminuir la variabilidad en el volumen de muestra que se inocula. Primero se agita la muestra, para homogeneizarla. Seguidamente, se introduce el asa de forma vertical en la muestra de orina y se retira. En estas condiciones, la cantidad que queda en el asa es la que corresponde a la calibración. La siembra cuantitativa consiste en realizar una estría a través del centro del agar y luego extender el inóculo en ángulos rectos respecto a la estría primaria. A continuación, la placa se gira 90° y el inóculo se extiende hasta cubrir toda la superficie. Otro tipo de siembra que se usa ampliamente en microbiología es la siembra por agotamiento, que no permite la cuantificación exacta,

pero tiene la ventaja de poder discernir con precisión la abundancia relativa de cada tipo de colonia, muy útil en infecciones mixtas o en muestras contaminadas. Desde el punto de vista práctico se puede combinar las dos técnicas de siembra, usando la mitad de la placa para el cultivo cuantitativo y la otra mitad para agotar y aislar las colonias que se van a usar para identificación y el estudio de sensibilidad antibiótica. Sea cual sea la técnica de siembra, es importante que permita realizar la cuantificación del inóculo de microorganismos causantes de ITU. No es aceptable la siembra de más de una muestra de orina por placa.

8.2.3 Condiciones de incubación

La mayoría de las infecciones urinarias están producidas por microorganismos que crecen en 18 horas. Sin embargo, en ciertos grupos de pacientes, con patología urológica y renal de base, o en los pacientes con el urocultivo convencional negativo y que no mejoran de los síntomas urinarios tras el tratamiento antibiótico, el cultivo puede precisar una incubación más prolongada (hasta 48 horas).

Las placas de agar sangre y agar chocolate se incubarán a 35-37° en atmósfera rica en CO₂. El medio CLED, los medios cromogénicos y agar MacConkey se incuban a 35-37° en aerobiosis.

En casos seleccionados, tal y como se ha mencionado antes, serán necesarias otras atmósferas de incubación.

8.2.4 Lectura e interpretación de los resultados cuantitativos

Los resultados del cultivo de orina son necesarios para el manejo clínico correcto de los pacientes. En la mayoría de los casos, las ITUs no complicadas se resuelven a los pocos días con el tratamiento empírico. Pero un porcentaje apreciable de casos no responden al tratamiento empírico elegido.

Diversas guías y autores han propuesto criterios para definir bacteriuria significativa, indicativa de ITU, en diferentes grupos de población. Sin embargo, la interpretación de los resultados del urocultivo no siempre es fácil. Los criterios originales propuestos por Kass se han ido modificando durante los años, ya que las evidencias acumuladas han demostrado que el número de bacterias en cultivo que traducen una ITU es variable y depende del sexo, la edad del paciente, la técnica de recogida de la muestra y del propio microorganismo aislado. Así, actualmente, inóculos tan bajos como 100 UFC/mL se consideran significativos si proceden de muestras obtenidas adecuadamente y se acompañan de síntomas específicos y piuria.

Pero la situación se complica aún más si tenemos en cuenta los siguientes factores: la orina obtenida por micción espontánea se contamina con facilidad con microbiota urogenital en el proceso de recogida; las sondas urinarias se colonizan rápidamente y se forman biopelículas; algunos cultivos de orina que se reciben en el laboratorio no están indicados clínicamente; la frecuencia de bacteriurias asintomáticas es alta en ciertas poblaciones; la información clínica que ayudaría al microbiólogo a valorar con criterio los resultados no está disponible en muchos casos; los parámetros adicionales, como piuria, no tienen sensibilidad y especificidad del 100% y también dependen de las técnicas empleadas para su detección. Además, los protocolos que se emplean en cada laboratorio para el urocultivo determinan el límite de detección de uropatógenos (siembra de 1 µL o de 10 µL, uso de medios no selectivos, incubación de 24h vs. 48h).

En la [Tabla 4](#) se resumen las recomendaciones en cuanto a la interpretación de urocultivo, haciendo hincapié en que estas recomendaciones se deben valorar en función de la información clínica disponible, que ningún criterio es absoluto y que todas las muestras pueden merecer una atención especial, que modifique los criterios generales de interpretación que hayan sido adaptados.

Tabla 4. Criterios de interpretación de resultados de urocultivos.

Tipo de muestra y paciente	Resultado significativo	Parámetros adicionales que valorar	Resultado probablemente no significativo	Informe/comentarios para el resultado significativo
OPS, cistoscopia, punción renal	Cualquier recuento	Piuria	Microbiota saprófita (contaminación por reflujo durante la aspiración)	Cultivo positivo (identificación a nivel de especie y antibiograma)
OME, mujer	≥ 100 UFC/mL*	Piuria, cilindros leucocitarios, tinción de Gram con microorganismos intraleucocitarios	Cultivo polimicrobiano Microbiota saprófita Presencia de abundantes células escamosas	Cultivo positivo (identificación a nivel de especie y antibiograma)
OME, varón	≥ 1.000 UFC/mL	Piuria, cilindros leucocitarios, tinción de Gram con microorganismos intraleucocitarios	< 1.000 UFC/mL Cultivo polimicrobiano Microbiota saprófita	Cultivo positivo (identificación a nivel de especie y antibiograma)
OSV	≥ 100 UFC/mL	Piuria	Microbiota saprófita (contaminación durante el procedimiento) Ausencia de piuria	Cultivo positivo (identificación a nivel de especie y antibiograma)
Sonda permanente	≥ 1.000 UFC/mL Puede haber varios microorganismos	Piuria	Cultivo polimicrobiano en paciente asintomático Ausencia de piuria	Cultivo positivo (identificación a nivel de especie y antibiograma). Los cultivos polimicrobianos, se informan como "cultivo mixto" y se recomienda recoger una nueva muestra tras el recambio de sonda.
OME, para diagnóstico de BA	≥ 100.000 UFC/mL 2 urocultivos con el mismo patógeno para mujer 1 urocultivo para hombre	Puede presentarse con o sin piuria	< 100.000 UFC/mL Cultivo polimicrobiano	Cultivo positivo (identificación a nivel de especie y antibiograma)

OME, orina de micción espontánea; OSV, orina obtenida por sondaje vesical; OPS, punción suprapúbica; BA, bacteriuria asintomática.

*Sólo se pueden valorar recuentos bajos si se siembran 10 μ L y si se dispone de información clínica (mujer joven con síntomas de cistitis).

Los cultivos con dos microorganismos deben ser valorados junto con datos clínicos (ITU complicada o no complicada), técnica de obtención de muestra, identidad de los aislados (uropatógeno o saprófita), presencia de piuria, etc. Los cultivos de tres o más microorganismos por norma general no son valorables y representan una contaminación/colonización. En casos concretos estos cultivos pueden ser valorados (por ejemplo, los pacientes con *stent* urinario), pero sólo si se dispone de los datos clínicos que lo justifican y tras interpretar los resultados junto con el médico solicitante. Las muestras de nefrostomía y ureterostomía se pueden considerar parecidas a la sonda permanente a efectos de interpretación de urocultivo, si se recogen sin recambiar el catéter. Estos resultados son de difícil interpretación por las elevadas tasas de colonización de los dispositivos. Por esta razón, se recomienda retirar el catéter y realizar la recogida de muestra tras la colocación del nuevo catéter en el caso de sospecha de ITU. En ningún caso se puede recoger la muestra para el cultivo de la bolsa colectora. En el caso de urostomías, no se recomienda la recogida de muestras a través de estoma del conducto ileal, ya que éste suele estar colonizado con microbiota y los resultados de cultivo son de difícil interpretación.

8.3 SISTEMAS AUTOMATIZADOS DE PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE ORINA

Las principales plataformas de automatización tienen el diseño modular y escalable, empezando por los módulos de siembra. Algunas de las características principales de tres sembradores automáticos (InoqulA de BD Kiestra, WASP de Copan y PREVI Isola de BioMerieux) están descritos en el procedimiento de la

de la SEIMC 1b. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología. Actualmente en España se comercializan InoquiA, WASP y Autoplak (NTE-SENER). PREVI Isola de BioMerieux está descatalogado, mientras que sobre el sistema PreLUD de 12A Diagnostics no hay datos suficientes. En la [Tabla 5](#) se indican las principales características de los tres sistemas de inoculación más evaluados.

Tabla 5. Principales características de los tres sistemas de siembra automática disponibles en el mercado.

Características	Autoplak	InoquiA	WASP
Medidas	1,85 m ancho x 2 m alto x 0,92 m fondo	4 m ancho x 1 m alto x 0,92 m	2 m ancho x 2 m alto x 1,1 m fondo
Taponado y destaponado automático	Si	Si	Si
Agitación	Si	Si	Si
Centrifugación	No	No	Si
Siembra	Asa calibrada de 1 μ L o 10 μ L (siembra cuantitativa), asas de 20 μ L y 30 μ L (no calibradas para siembra semicuantitativa)	Toma de muestra con una pipeta calibrada, volumen mínimo 10 μ L, extensión sobre la placa con una bola magnética	Asa calibrada de 1 μ L, 10 μ L o 30 μ L
Toma de la muestra	El instrumento se calibra para cada tipo de tubo para que el asa penetre a una profundidad determinada	La pipeta penetra a la profundidad de 15 mm de la superficie gracias a un sensor que detecta el nivel de líquido en la muestra	El asa penetra a una profundidad fija que depende del tipo de contenedor de muestras
Permite distintos patrones de siembra	Si	Si	Si
Filtro HEPA	Si	Si	Si
Placa cerrada durante la siembra	No	Si (excepto el modo semiautomático)	Si
Esterilización entre muestras	Incineración	Inoculación con puntas desechables. Para la extensión de la muestra se utilizan bolas magnéticas que se recogen después de su uso y se esterilizan en autoclave	Incineración
Número de muestras que se puede cargar a la vez	Hasta 120	Hasta 270	Hasta 72
Número de tipos de medios de cultivo que se puede usar simultáneamente	11	12	9
Capacidad total de placas cargadas en el sembrador	480	720	350
Número de placas que se siembran a la vez	1	5	1
Inoculaciones por hora	Hasta 140/h	Hasta 235/h	Hasta 180/h

Los estudios que comparan los sistemas automáticos con procesamiento manual de orinas coinciden en que los primeros aumentan la reproducibilidad y también permiten mejor aislamiento de las colonias de microorganismos, lo que evita los reaislamientos y por lo tanto demoras en el tiempo de identificación y estudio de sensibilidad. Algunos estudios han demostrado mayores tasas de recuperación de microorganismos más exigentes, tales como *Alloscardovia omnicoles*, *G. vaginalis*, *Actinomyces* spp., *Aerococcus* spp. o *A. schaalii*.

En cuanto a los tiempos de procesamiento de muestras y obtención de resultados, el impacto de la automatización dependerá en gran medida de los flujos de trabajo en cada laboratorio. Aunque casi todos los estudios demuestran un aumento importante de productividad entre el periodo pre y post-implementación de plataformas automatizadas, la reducción del tiempo hasta el resultado final para las muestras de orina se consigue principalmente gracias a los cultivos negativos que no necesitan una revisión por parte de microbiólogo, sin un impacto significativo en los tiempos hasta la identificación y el resultado de antibiograma de cultivos positivos, si la lectura de las placas se realiza en el mismo horario que sin tener sistemas automáticos. Todos los estudios coinciden en que la máxima eficiencia de las plataformas de automatización se consigue si se trabaja en el modo 7/24, lo que permitiría una lectura y posterior procesamiento de las muestras en el momento de la toma de la primera imagen de la placa de cultivo tras el tiempo de incubación establecido (14-18 horas).

Otro tipo de sistemas automatizados disponibles son los instrumentos HB&L, Alfred 60AST y Sidecar de Ali-fax. HB&L es un sistema semiautomático para el cultivo y la detección rápida de crecimiento bacteriano en las muestras de orina y otras muestras biológicas, así como para el estudio de sensibilidad a los antibióticos. El sistema HB&L permite detectar crecimiento de microorganismos basándose en el análisis de dispersión de luz y proporcionando las curvas de crecimiento, así como el recuento estimado del inóculo en UFC/mL. El cribado de muestras de orina requiere una incubación de 3 horas (para detectar recuentos de ≥ 10.000 UFC/mL) o de 4 horas (para detectar recuentos de $\geq 800 - 1.000$ UFC/mL), después de que, si no se detecta el crecimiento, las muestras se consideran negativas y pueden ser descartadas. Si se detecta el crecimiento en los viales de HB&L, las muestras originales, que se deben conservar refrigeradas, se deben sembrar de manera cuantitativa manualmente. Para las muestras positivas el análisis de turbidez en la escala de McFarland permite detectar automáticamente cuándo el cultivo alcanza el inóculo que corresponde a 0,5 McFarland para proceder al estudio de sensibilidad, previa tinción de Gram y/o identificación mediante MALDI-TOF. El sistema dispone de viales con el medio de cultivo especial para las muestras de orina y de líquidos biológicos, así como un panel amplio de antibióticos para el estudio de sensibilidad. Siendo el sistema semiautomático, se necesita una intervención del usuario para inocular las muestras, preparar los viales con antibióticos e inocularlos con las muestras positivas que han alcanzado la turbidez de 0,5 McFarland. A diferencia de HB&L, Alfred 60AST es un sistema completamente automático que permite inocular, incubar y monitorizar el crecimiento de microorganismos en los viales. Permite una dispensación automática de las muestras y reactivos y tiene un área refrigerada para los antibióticos y viales que alcanzaron 0,5 McFarland. La siembra cuantitativa de muestras originales se realiza manualmente. Sidecar incluye un sembrador automático con la capacidad para 240 placas y 12 tipos diferentes de medios de cultivo, así como un incubador de 37°C con la capacidad para 240 placas. Este sistema inocular las muestras originales con un asa que se esteriliza por calor entre las siembras. Permite configurar distintos patrones de siembra y tiene un filtro HEPA. Combinado con Alfred 60AST y/o HB&L, Sidecar permite automatizar el procesamiento de las muestras de orina, incluido el cribado por crecimiento de muestras negativas, acortando de esta manera el tiempo de respuesta. Una ventaja es la posibilidad de tener una identificación y un resultado preliminar de sensibilidad antibiótica el mismo día de obtención de la muestra.

8.4 MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE PATÓGENOS URINARIOS

8.4.1 A partir de cultivo

Una vez obtenido el crecimiento en los medios de cultivo correspondientes, se aplican las técnicas de identificación que se pueden dividir en dos grupos principales: métodos basados en las pruebas bioquímicas y basados en la proteómica.

1. Las técnicas basadas en las pruebas bioquímicas incluyen básicamente los sistemas comerciales automatizados, tales como MicroScan Walkaway (Beckman Coulter), Phoenix (Becton Dickinson Diagnostic Systems) o Vitek (bioMérieux), entre otros. Los paneles que combinan la parte de galería metabólica y la parte que contiene los antimicrobianos en distintas concentraciones permiten obtener tanto la identificación como la sensibilidad de los microorganismos. MicroScan agrega automáticamente los reactivos necesarios, incuba, lee e interpreta los resultados sin necesidad de intervención del operador, aunque los paneles permiten también la lectura visual, a diferencia de los sistemas Vitek y Phoenix que son sistemas cerrados. Las galerías multipuebas manuales, tales como API (bioMérieux) o MicroID (Remel), tienen un uso más limitado desde la introducción de la espectrometría de masas al laboratorio de Microbiología.

2. El procedimiento para la identificación de microorganismos mediante espectrómetro de masas tipo MALDI-TOF a partir de colonia está descrito en el Procedimiento de la SEIMC 65. “Aplicaciones de la espectrometría de masas MALDI-TOF en Microbiología Clínica” (2019), en el PNT-MT-01 “Identificación de microorganismos en cultivo mediante espectrometría de masas MALDI-TOF”. Para la identificación fiable de la mayoría de patógenos urinarios es suficiente el proceso de identificación directa, que incluye extender una pequeña cantidad de una colonia de microorganismo sobre un pocillo de la placa de MALDI-TOF y cubrir con 1 μ L de la matriz, o con una extracción *intarget*, añadiendo 1 μ L de ácido fórmico al 70% a la muestra extendida sobre el pocillo. No obstante, en algunos casos es necesario realizar el procedimiento de extracción de proteínas, sobre todo, si se trata de levaduras. El impacto del tipo de medio de cultivo en la identificación mediante MALDI-TOF es mínimo. En los estudios comparativos se ha demostrado que las tasas de identificación correcta de patógenos urinarios son las mismas para los medios cromogénicos, CLED y los medios no selectivos. No obstante, el *score* suele ser ligeramente más bajo para los medios cromogénicos.

8.4.2 A partir de muestra directa

MALDI-TOF

Las muestras directas deben cumplir una serie de requisitos para poder aplicar la identificación directa mediante MALDI-TOF:

1. Suficiente volumen de la muestra, 2. Suficiente inóculo de microorganismo, 3. No ser excesivamente purulentas o viscosas, 4. Población monomicrobiana.

La muestra de orina es una de las pocas muestras que suele cumplir la mayoría de las condiciones. No obstante, la orina es una de las muestras más comunes en el laboratorio de Microbiología Clínica. Por este motivo, son necesarias las técnicas de cribado previo a la aplicación de MALDI-TOF. Los principales métodos que se han usado para este objetivo son la tinción de Gram y la citometría de flujo. La tinción de Gram tiene la ventaja de estar disponible en cualquier laboratorio. Es un método fácil de realizar, muy económico y permite no sólo detectar la presencia de bacterias, sino también discriminar entre las infecciones mono y polimicrobianas, así como descartar orinas contaminadas. Entre las desventajas de la tinción de Gram se puede mencionar que requiere más tiempo, es subjetiva y depende de la experiencia del observador. Por su parte la citometría de flujo proporciona el recuento de las bacterias por μ L, requiere tan solo un minuto para procesar una muestra y ofrece los parámetros cuantitativos adicionales de interés, tales como recuento de leucocitos, hematíes o de células epiteliales. Como desventajas se puede citar su precio, su poca fiabilidad en la detección de levaduras y que es una técnica menos exacta en cuanto a la discriminación entre las infecciones mono y polimicrobianas. Es necesario establecer un punto de corte de recuento bacteriano a partir del cual se aplicará la identificación directa mediante MALDI-TOF.

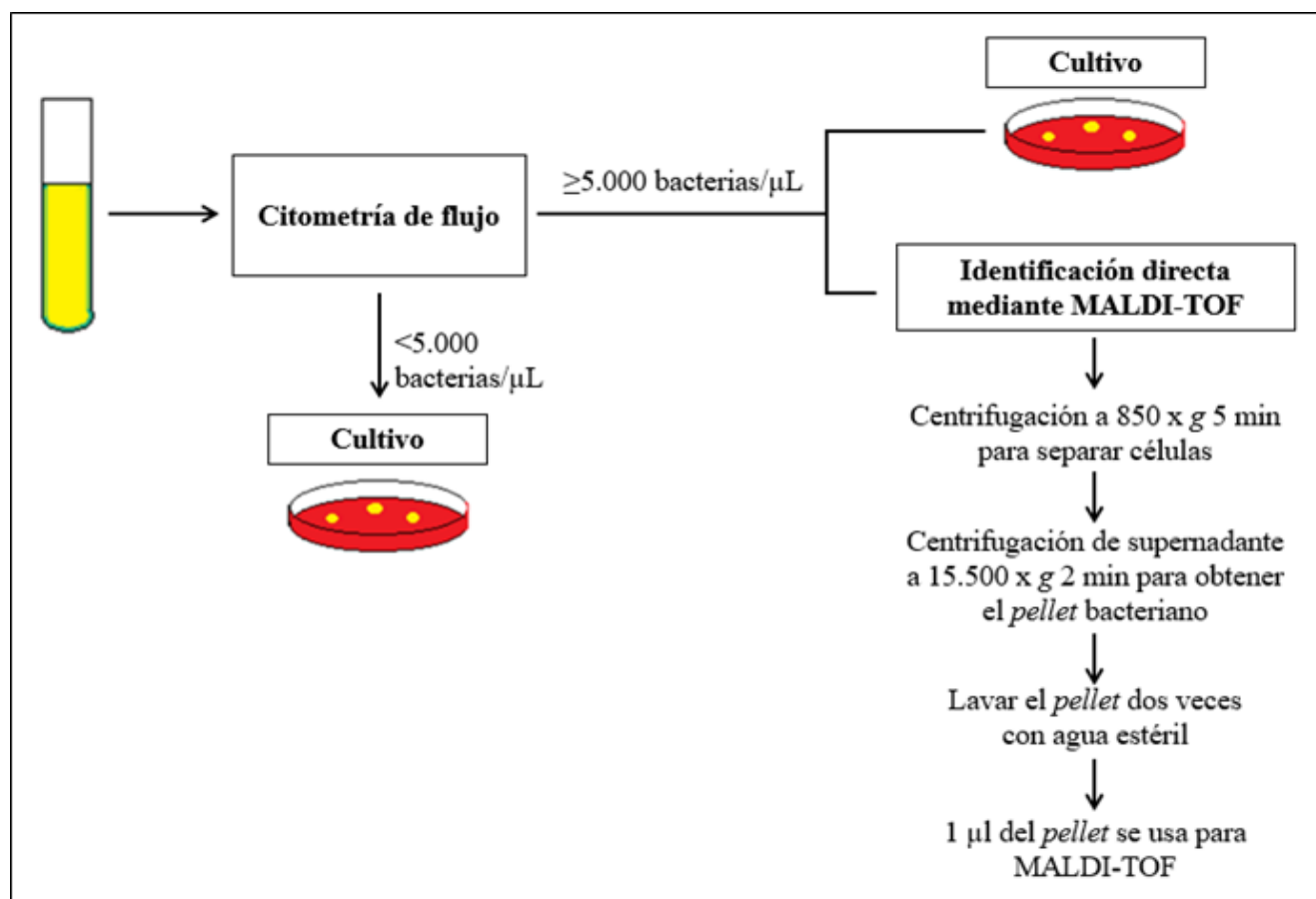
En la [Tabla 6](#) se indican los puntos de corte de citometría de flujo para aplicar protocolos de identificación directa y estudios de sensibilidad. En la [Figura 2](#) se describe el protocolo de identificación directa mediante MALDI-TOF.

Tabla 6. Puntos de corte de recuento bacteriano por citometría de flujo usados en algunos estudios de manera prospectiva para aplicar los protocolos de identificación directa y/o detección de resistencias y estudios de sensibilidad.

Estudio	Volumen de orina	Recuento de bacterias en citometría de flujo	% de identificación directa válida en muestras positivas por cultivo	Estudios adicionales realizados con el <i>pellet</i> bacteriano
Zboromyrska <i>et al.</i> 2016	10 mL	$\geq 5 \times 10^6$ bacterias/mL	86,4%	Antibiograma por disco-placa
Oviaño <i>et al.</i> 2017	10 mL	$\geq 1.5 \times 10^5$ bacterias/mL	91%	Detección de carbapenemasas mediante MALDI-TOF
Li <i>et al.</i> 2019	10 mL para identificación directa 10 mL para antibiograma	$\geq 5 \times 10^6$ bacterias/mL	86,4%	Antibiograma con VITEK 2

Una vez detectadas las orinas presuntamente positivas, se procede a la preparación de la muestra para el análisis mediante MALDI-TOF (véase el PNT-UR-04 de este procedimiento).

Figura 2. Protocolo de identificación directa mediante MALDI-TOF (adaptado del artículo de Zboromyrska *et al.*)



Debido al elevado número de orinas positivas, así como el tiempo que se requiere para el análisis directo mediante MALDI-TOF, actualmente la identificación directa en la mayoría de los laboratorios se aplicaría a las muestras de pacientes en cuyo caso el diagnóstico rápido supone un beneficio clínico importante, como pueden ser los pacientes con sospecha de sepsis de origen urinario, pacientes graves con pielonefritis, pacientes hospitalizados con sospecha de ITU por bacterias multirresistentes, etc.

Una vez obtenida la identificación mediante MALDI-TOF, el mismo *pellet* recuperado se puede usar para adelantar el estudio de resistencias mediante procedimientos convencionales (la difusión con discos, las tiras de gradiente, sistemas automáticos) o mediante las técnicas rápidas (colorimétricas, moleculares, MALDI-TOF, inmunocromatografía, etc.).

En el caso de no obtener una identificación directa fiable a partir del *pellet* o si éste es insuficiente para realizar la identificación y posteriores estudios, se puede realizar un subcultivo de corta incubación (3-5 h) en un medio no selectivo (agar sangre), sembrando un par de gotas de orina (aproximadamente 100-200 μ L cada gota) sin extender. Este método es sobre todo rentable para las muestras con recuentos bacterianos altos (≥ 100.000 UFC/mL en el cultivo cuantitativo) y bacilos Gram-negativos, especialmente *Enterobacterales*. El protocolo de subcultivo de corta incubación pueden ser una alternativa asumible para los laboratorios que no disponen de tiempo de personal técnico suficiente para realizar la preparación de muestras para identificación directa.

En resumen, la identificación directa mediante MALDI-TOF no sólo tiene la ventaja de acortar el tiempo de diagnóstico microbiológico, sino que también puede servir para detectar bacterias que no crecen en cultivo (bacterias que requieren medios de cultivo o condiciones de incubación especiales, bacterias no viables por el efecto de tratamiento antibiótico, etc.) o de crecimiento lento. No obstante, hay que tener en cuenta que MALDI-TOF necesita un número elevado de microorganismos para una identificación fiable, en general superior a 10^5 UFC/mL, mientras que el cultivo permite recuperar los microorganismos a partir de 100 UFC/mL si se siembra con el asa de 10 μ L. Otra limitación son los cultivos con dos microorganismos relevantes. En este caso la identificación puede no ser fiable o identificarse el microorganismo predominante. Por otro lado, las orinas contaminadas con altos recuentos de bacterias también pueden dar una identificación válida si uno de los microorganismos presenta recuentos más elevados. La valoración conjunta de otros parámetros proporcionados por el citómetro, como, por ejemplo, la presencia de abundantes células escamosas o el recuento de leucocitos, puede ayudar a detectar las orinas potencialmente contaminadas y tomar los resultados de identificación directa con más cautela.

Hibridación in situ con sondas fluorescentes (FISH)

La técnica de hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH) detecta secuencias de ácidos nucleicos mediante unas sondas marcadas con un fluorocromo y permite la posterior detección de fluorescencia mediante visualización al microscopio. Para la identificación de bacterias se usan las sondas específicas del ARN ribosomal (ARNr). Las sondas pueden ser de oligonucleótidos (oligo-FISH o ADN-FISH) o sondas de ácido nucleico peptídico (PNA-FISH). El uso como diana del ARNr 16S ha permitido diseñar unas sondas específicas para ciertas especies de mayor interés clínico. La abundancia de ARNr en las células permite detectar microorganismos directamente sin necesidad de amplificación previa de ácidos nucleicos. Aunque esta técnica se ha desarrollado para la identificación de microorganismos en los hemocultivos positivos, hay algunos trabajos en los que se ha aplicado en otros tipos de muestras, incluida la orina. Las principales limitaciones son el número limitado de patógenos que se pueden detectar, el tiempo hasta el resultado de 2-4 horas, el límite de detección que suele ser $\geq 10^4$ UFC/mL y la necesidad de microscopio de fluorescencia.

Técnicas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos y secuenciación del genoma.

Aunque los métodos moleculares se usaron ampliamente para la detección de microorganismos en las muestras clínicas, en el diagnóstico de ITU su implementación se ve afectada por varios problemas: una alta variedad de patógenos implicados, necesidad de resultado cuantitativo, presencia de microbiota comensal, etc. Además, hay que contar con la necesidad de equipamiento especial y costes elevados en comparación con el urocultivo. Algunos trabajos han evaluado ensayos diseñados para otros tipos de muestra, como por ejemplo SeptiFast (Roche Diagnostics GmbH), para el diagnóstico de ITU obteniendo los resultados de sensibilidad

aceptables para la detección de los patógenos más frecuentes e incluidos en el *kit*, aunque con la limitación importante de no poder cuantificar los microorganismos. En otros estudios se han diseñado PCR o qPCR para la detección de uropatógenos determinados, como *E. coli*. En estos casos las técnicas moleculares han mostrado una mayor sensibilidad que el urocultivo entre los pacientes sintomáticos, sin detectar mayor número de orinas positivas en el grupo control.

En los últimos años los estudios de microbiota del tracto urinario han despertado un gran interés por la aplicación de las técnicas moleculares en el campo de la ITU. Recientemente McDonald *et al.* han publicado un estudio comparativo entre el urocultivo con estudio de la sensibilidad convencional y la ADN NGS (*next-generation sequencing*). En este estudio los pacientes con cistitis aguda se dividieron en dos grupos. El primer grupo se trató según los resultados de urocultivo convencional y el segundo grupo según los resultados de la NGS. Hay que resaltar que el cultivo fue positivo en 13 de 44 pacientes sintomáticos, mientras que en el grupo de la NGS fue positivo en todos los pacientes. Se observó una mejora clínica más significativa en el grupo tratado de acuerdo con los resultados de la NGS. Entre otros hallazgos importantes de la NGS cabe destacar la detección de bacterias anaerobias en 20 de 44 pacientes y la presencia de microbiota polimicrobiana en 34 de 44 pacientes sintomáticos. A pesar del beneficio demostrado en el grupo de pacientes sintomáticos, hay que resaltar que la NGS detectó microorganismos en 21 de 22 muestras en el grupo control, lo que de nuevo plantea las preguntas sobre la interpretación de los resultados de estas técnicas moleculares. En 2019 Sathiananthamoorthy *et al.* publicaron un estudio donde se utilizó la técnica de secuenciación del gen 16S ARNr en comparación con el urocultivo convencional para el diagnóstico de pacientes con síntomas urinarios recurrentes. Los autores observaron que las enterobacterias eran un grupo de microorganismos asociados con presencia de sintomatología, mientras que los estreptococos se encontraban con mayor frecuencia en el grupo control. Igual que en el anterior trabajo, este estudio ha demostrado que el urocultivo es menos sensible en la detección de uropatógenos reconocidos como las enterobacterias, y vuelve a poner de manifiesto el significado de infecciones polimicrobianas. Un hallazgo importante es que los autores observaron diferencias en la representación de distintos grupos taxonómicos en las muestras directas y procesadas tras centrifugación, probablemente debido a la presencia de bacterias adheridas a las células o incluso intracelulares. Es un dato importante a tener en cuenta para el diseño de los futuros estudios. En este trabajo se utilizó la plataforma MiSeq, que según los propios autores no les ha permitido llegar a la diferenciación fiable a nivel de especie. La plataforma MinION resuelve esta limitación, ya que permite reconstruir >90% del gen 16S ARNr. Además, en el trabajo de Schmidt *et al.* los autores demostraron que utilizando la plataforma MinION son capaces de obtener el resultado de la identificación y la detección de marcadores de resistencia en tan solo 4 horas, aunque con ciertas limitaciones, tales como la necesidad de una cantidad importante de ADN bacteriano para el análisis y la incapacidad para detectar ciertos marcadores de resistencia, sobre todo las mutaciones cromosómicas.

8.5 ESTUDIO DE SENSIBILIDAD DE PATÓGENOS URINARIOS

8.5.1 Métodos convencionales

Las técnicas convencionales de estudio de sensibilidad que más se utilizan son método de difusión con disco (Kirby-Bauer) y los sistemas automáticos de microdilución. Los protocolos de preparación de la muestra están descritos en el Procedimiento SEIMC nº 11 “Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos” (2000) y en el PNT-UR-02 del Procedimiento SEIMC nº 14a “Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinario” 2010. El método de difusión con disco solo proporciona la categoría clínica de sensible, intermedio y resistente, mientras que los paneles de microdilución permiten obtener las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para cada antibiótico estudiado. La lectura de discos puede ser manual o automatizada, utilizando los lectores y software específicos de interpretación. Un ejemplo es el sistema SIRScan 2000 (i2a, *intelligence artificielle applications*), que permite hacer lectura visual de las imágenes de antibiograma por disco-placa, así como utilizar el sistema experto personalizable para la interpretación de resultados. Asimismo, las plataformas de automatización total o parcial descritos previamente también están desarrollando un programa informático de lectura e interpretación digital de los halos de disco-placa. Una de las ventajas del método de disco-placa es que se puede elegir los antibióticos que se quieren incluir en cada estudio. Los discos deben colocarse de manera que permitan la detección fenotípica de mecanismos de resistencia.

En el caso de los paneles de microdilución, los resultados se leen y se interpretan automáticamente. Las casas comerciales suelen tener un panel específico para patógenos urinarios que incluyen a los antibióticos y diluciones recomendados para el tratamiento de la infección urinaria. Las condiciones de inóculo, tiempo de incubación, interpretación de los resultados son estandarizadas y dependen del panel comercial. Atendiendo a las necesidades de disponer de mayor número de antimicrobianos activos frente a las cepas multirresistentes, algunos de los paneles comercializados han incluido recientemente los antibióticos de más reciente comercialización, tales como ceftolozano/tazobactam, ceftazidima/avibactam, ceftarolina, ceftobiprole, etc.

Los resultados del antibiograma se interpretan de acuerdo con los puntos de corte proporcionados por los organismos competentes, tales como el EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) *Clinical breakpoints* (http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/) en Europa o el CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) *M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* en EE.UU. Estos documentos se revisan constantemente y por lo tanto siempre se debe usar la última versión vigente. Actualmente la mayoría de los laboratorios de España trabajan con los puntos de corte de EUCAST, que son de libre acceso a través de la página web anteriormente indicada. Los proveedores de los sistemas automáticos de antibiograma también deben adaptar sus paneles a los cambios de puntos de corte, aunque es evidente que es un proceso mucho más lento, ya que requiere cambios a nivel de producción. Por eso, otra ventaja del método de difusión con disco es su flexibilidad y rápida adaptación a los cambios: permite una introducción inmediata de los cambios en la interpretación de puntos de corte y también permite incluir de forma rápida nuevos antibióticos indicados para cierto tipo de infección o ciertas especies de microorganismos. La principal desventaja es el tiempo que se requiere para su realización, así como para la lectura de los resultados, aunque las soluciones que permiten automatizar la preparación de inóculo, inoculación de placas de cultivo, colocación de discos, incubación y toma de imágenes al cabo de un tiempo establecido, así como la lectura digital asistida por programas informáticos de interpretación (programas expertos), pueden solventar este problema en un futuro próximo.

Tanto en el caso de estudio de sensibilidad por el método de difusión con disco, como con los paneles de microdilución, a veces es necesaria una confirmación fenotípica del mecanismo de resistencia subyacente. Los principales métodos de la detección fenotípica de resistencias están descritos en el Procedimiento SEIMC nº38. “Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos” (2011) y el Procedimiento SEIMC nº39. “Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en grampositivos” (2011).

8.5.2 Técnicas rápidas de detección de resistencias a partir de cultivo o muestra directa

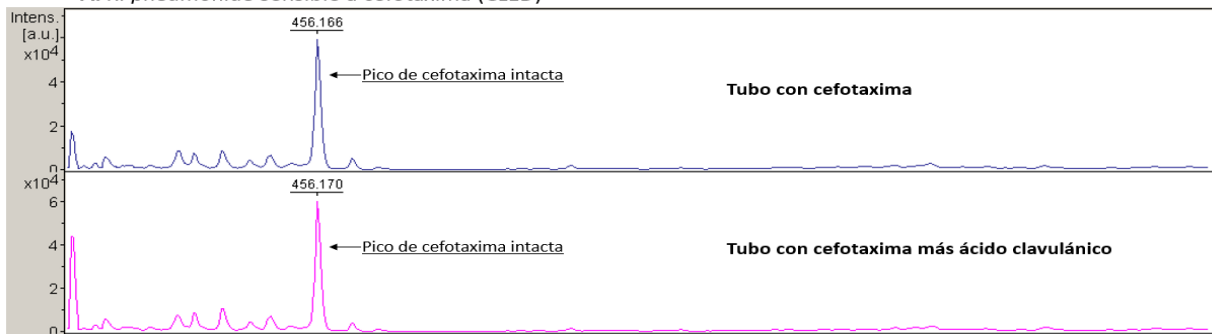
8.5.2.1 MALDI-TOF

El protocolo de detección de resistencias mediante MALDI-TOF a partir de cultivo está descrito en el PNT-MT-01 del Procedimiento SEIMC nº65. “Aplicaciones de la espectrometría de masas MALDI-TOF en Microbiología Clínica” (2019) y puede ser aplicado a las colonias o al sedimento bacteriano obtenido a partir de la muestra directa de orina, utilizando el mismo protocolo para la obtención del *pellet* que el utilizado para la identificación directa descrito en el PNT-UR-04 de este procedimiento. Para la detección de BLEE se usa una cefalosporina de tercera generación, ceftriaxona o cefotaxima, con y sin inhibidor de β -lactamasa (ácido clavulánico o tazobactam) para permitir la detección de enzimas de clase A, mientras que para la detección de carbapenemasas se usa un carbapenem. La bacteria se resuspende en una solución con el antibiótico y se incuba entre 30 min y 2 horas. Después se comparan los espectros de antibiótico antes y después de la incubación. La técnica de detección de carbapenemasas a partir de la muestra directa de orina demostró una excelente sensibilidad y especificidad en un estudio realizado por Oviaño *et al.* En la [Figura 3](#) se pueden observar ejemplos de resultados del ensayo de detección de BLEE realizados a partir de colonias (CLED) y muestra directa.

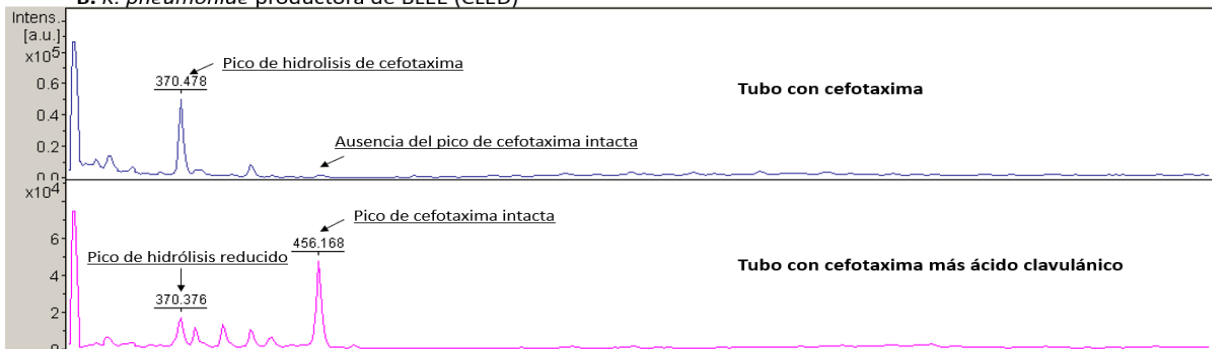
Figura 3. Ejemplos de espectros de hidrólisis de cefotaxima (CTX) con y sin presencia del ácido clavulánico (AC) en el ensayo de detección de BLEE mediante MALDI-TOF tras la incubación de 2 h. **A.** Ejemplo de resultado para una cepa sensible: la técnica realizada a partir de colonias crecidas en la placa de CLED,

tanto en el tubo sin AC como en el tubo con AC se detecta el pico de CTX intacto. **B.** Cepa productora de BLEE: a partir de colonias crecidas en la placa de CLED, en el tubo sin AC se detecta el pico del producto de hidrólisis de CTX, mientras que en el tubo con AC sigue detectándose el pico de CTX intacto. **C.** Cepa productora de β -lactamasa tipo AmpC: a partir de colonias crecidas en la placa de CLED, en ambos tubos se detecta hidrólisis de CTX, no se detecta la inhibición en el tubo con AC. **D.** Cepa productora de BLEE: la técnica realizada a partir de *pellet* bacteriano recuperado de la muestra directa, en el tubo sin AC se detecta el pico del producto de hidrólisis de CTX, mientras que en el tubo con AC sigue detectándose el pico de CTX intacto.

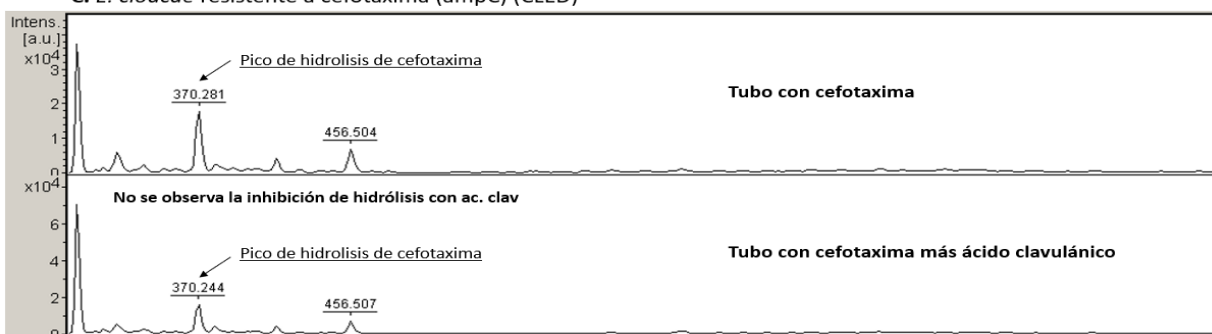
A. *K. pneumoniae* sensible a cefotaxima (CLED)



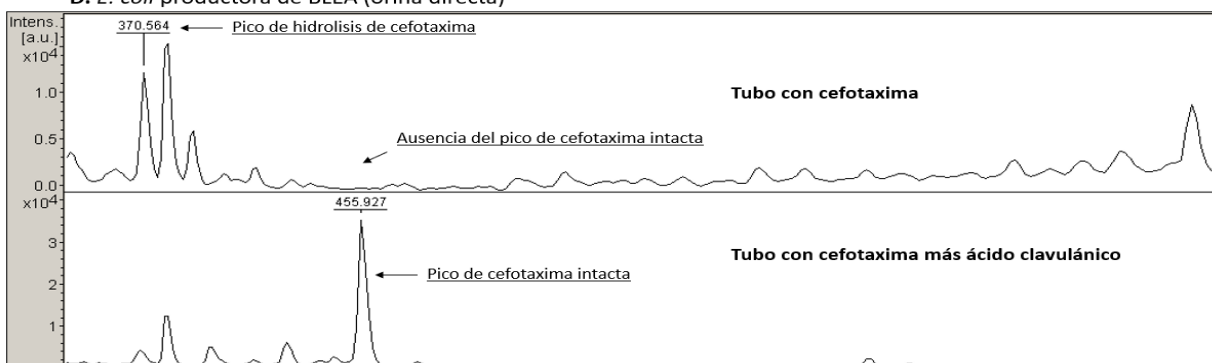
B. *K. pneumoniae* productora de BLEE (CLED)



C. *E. cloacae* resistente a cefotaxima (ampC) (CLED)



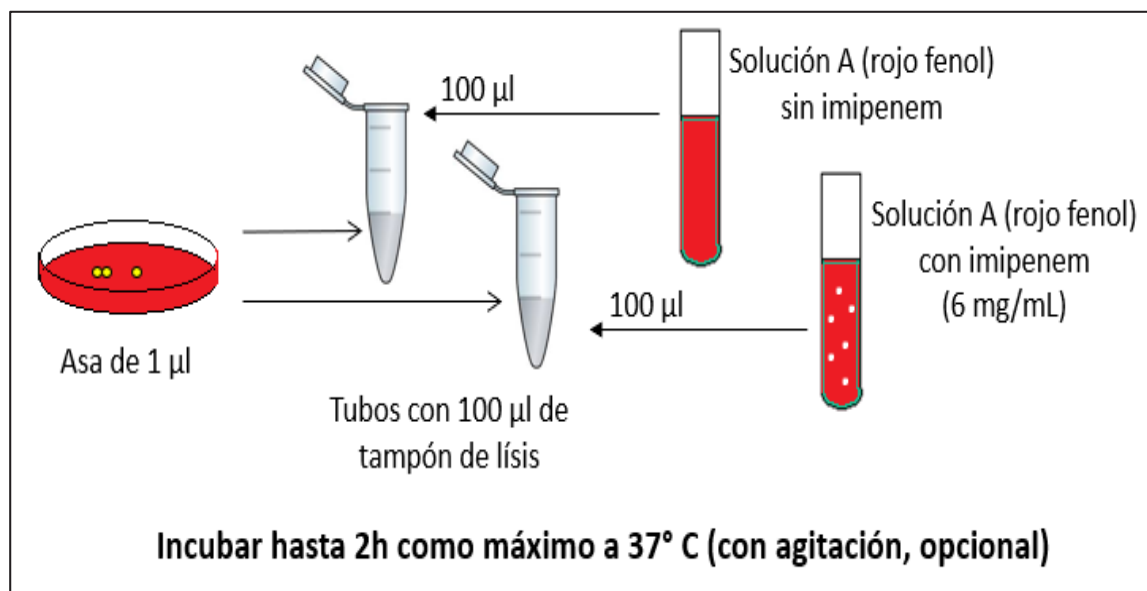
D. *E. coli* productora de BLEA (orina directa)



8.5.2.2 Pruebas colorimétricas

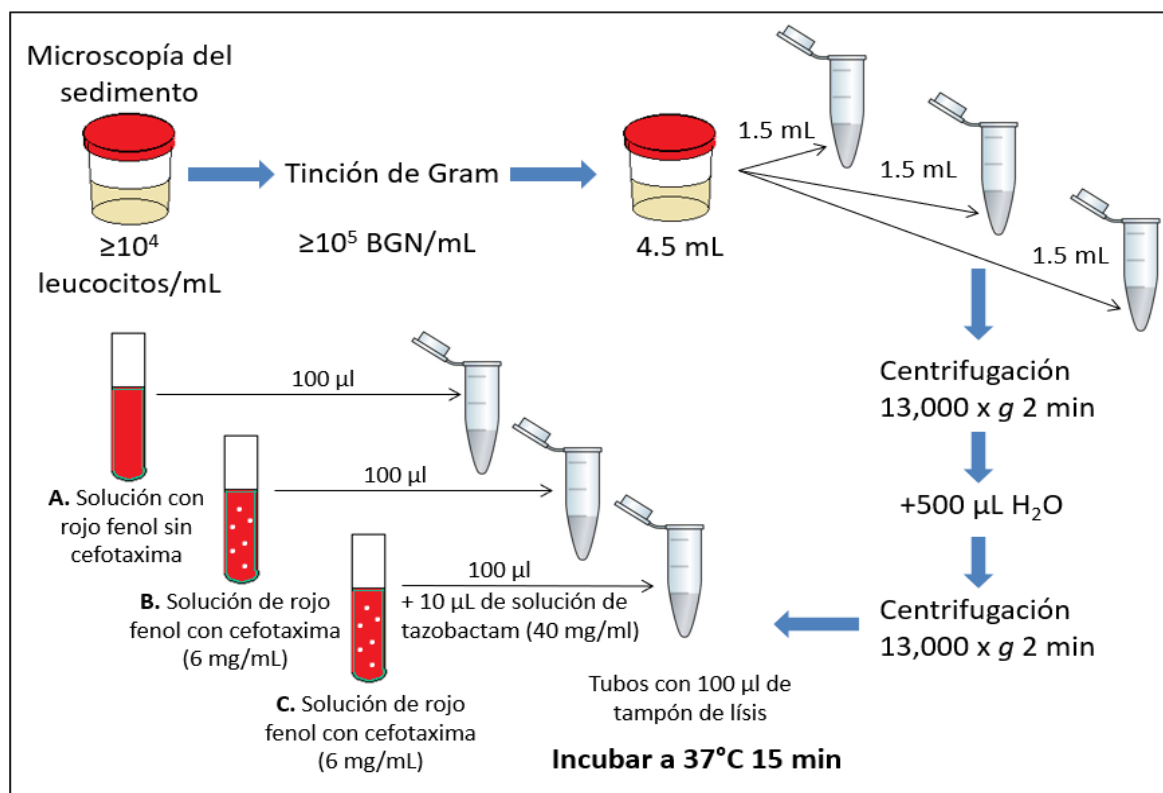
En los últimos años los métodos colorimétricos de detección de resistencia se han usado ampliamente en los laboratorios de Microbiología. En 2012 Nordmann y Poirel describieron un ensayo que permite de manera rápida detectar presencia de carbapenemasas a partir de colonias aisladas en los medios de cultivo: Carba NP test. Posteriormente los mismos autores describieron una prueba semejante para la detección de BLEE: ESBL NDP test. La detección se basa en el cambio de pH que se produce en el caso de hidrólisis del antibiótico diana en presencia de una β -lactamasa, que se detecta mediante un indicador de color. Las técnicas de Carba NP y ESBL NDP usan como indicador el rojo fenol que cambia de rojo a amarillo, si baja el pH. El protocolo inicial de Carba NP requería una lisis de 30 min y se realizaba utilizando placas de 96 pocillos, pero con el tiempo el protocolo se ha ido simplificando. El protocolo modificado de la técnica Carba NP está resumido en la **Figura 4**. La ventaja de la prueba Carba NP es que se la puede implementar en cada laboratorio, ya que el protocolo de preparación y mantenimiento de reactivos, así como la interpretación de resultados están descritos en la literatura de manera detallada.

Figura 4. Protocolo modificado de la técnica Carba NP para la detección de carbapenemasas.



Actualmente estas pruebas existen en el formato comercial, por ejemplo, β -CARBA (Bio-Rad) o RAPIDEC CARBA NP (bioMérieux). El método casero ha demostrado ser igual de sensible y específico que las técnicas comerciales, siendo 10 veces más barato. La prueba de carba NP ha sido ampliamente evaluada y actualmente se recomienda su uso para la detección de carbapenemasas en Enterobacterales y *P. aeruginosa*, donde la sensibilidad y especificidad suelen ser de 70-100% y 90-100%, respectivamente. Los aislados con carbapenemasa tipo OXA-48-like demuestran una sensibilidad algo inferior. En cambio, la sensibilidad en cepas de *Acinetobacter* spp. suele ser baja (de tan solo 18% en algunos estudios), por lo que no se recomienda su uso en esta especie. El sistema Carba NP test II se ha diseñado para poder no solo detectar la presencia de una carbapenemasa sino además diferenciar entre las clases A, B y D de Ambler mediante la utilización de inhibidores, tales como tazobactam para la clase A y EDTA para metalo- β -lactamasas. La producción de la carbapenemasa de clase D se deduce por la ausencia de inhibición por ambos inhibidores. En cuanto a la detección de BLEE, el sistema ESBL NDP test ha demostrado una sensibilidad y especificidad cercanas al 100%, sobre todo para la detección de BLEE del grupo CTX-M. Esta técnica ha sido evaluada también utilizándola directamente en muestras de orina, demostrando una sensibilidad del 98% y una especificidad del 99,8%. El protocolo descrito en el artículo de Dortet *et al.* está ilustrado en la **Figura 5**.

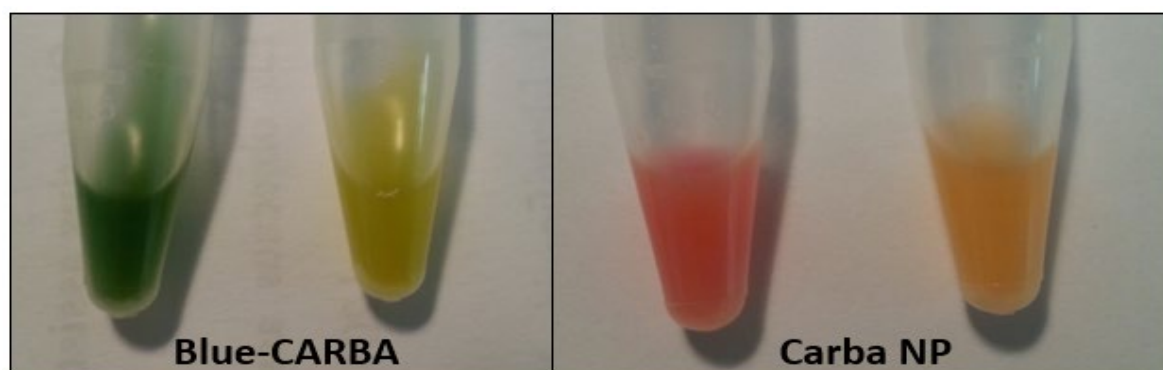
Figura 5. Protocolo de la técnica ESBL NDP aplicada a las muestras directas de orina (según la descripción del artículo de Dortet *et al.*)



Existe una técnica comercial, β -Lacta test, que está diseñada para detectar no solo BLEE, sino también otro tipo de β -lactamasas, tales como cefamicinasas plasmídicas o hiperproducción de β -lactamasas cromosómicas de tipo AmpC. Esta técnica fue evaluada en un estudio con el *pellet* recuperado de 200 orinas, mostrando una sensibilidad de 94% y una especificidad de 100% para la detección de BLEE.

Existe una modificación de la técnica que utiliza otro tipo de indicador de cambio de pH, el azul de bromotimol, la prueba de Blue-CARBA. Su análogo comercial es el RAPID CARB Blue kit (Rosco). La descripción de estas técnicas se ilustra en la [Figura 6](#).

Figura 6. Ejemplo de los ensayos de Blue-CARBA y Carba NP con resultado positivo.

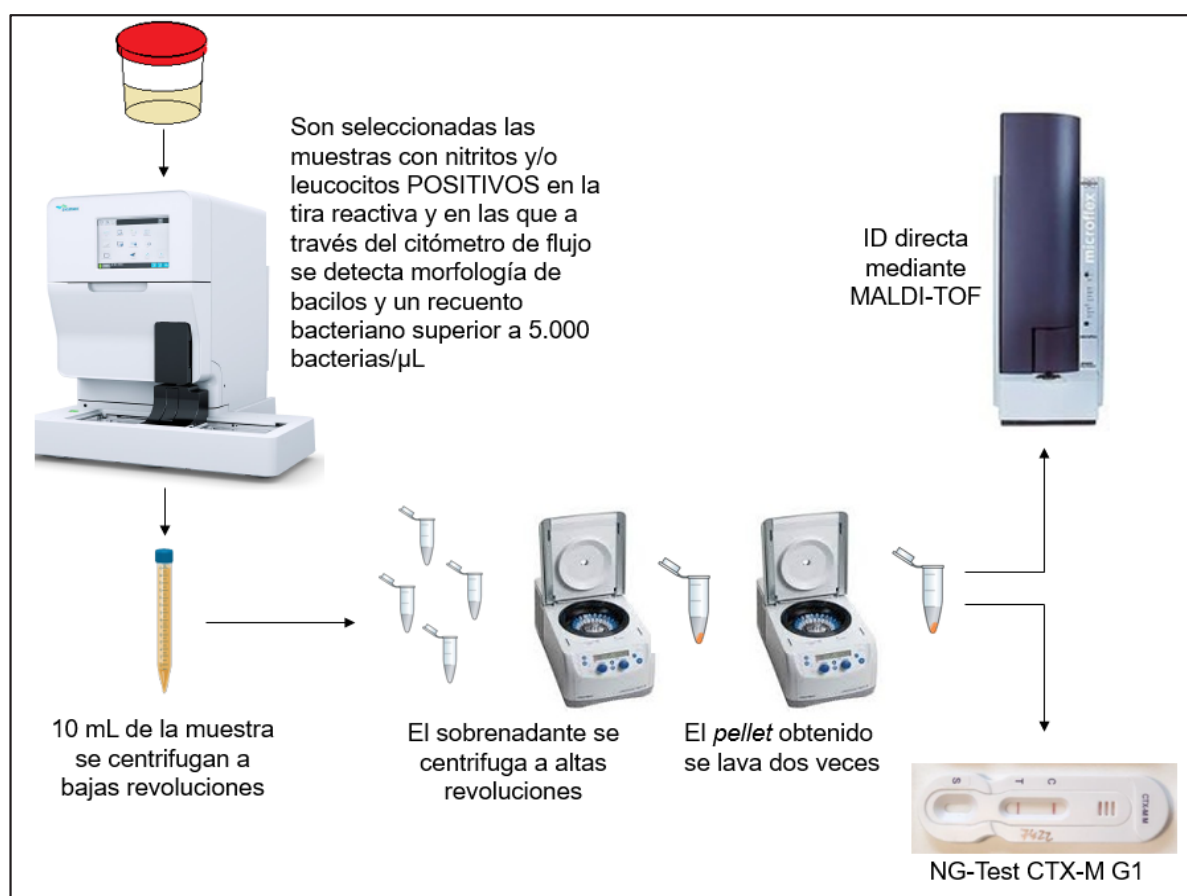


El protocolo para realizar la prueba de Carba NP a partir de colonias de bacilos Gram-negativos aislados en cultivo o directamente en muestra de orina (el *pellet*) está descrito en el PNT-UR-05 de este procedimiento.

8.5.2.3 Inmunocromatografía

Los ensayos de inmunocromatografía se basan en la detección de la reacción antígeno-anticuerpo sobre el papel de nitrocelulosa. Estos ensayos presentan varias ventajas en comparación con otras técnicas rápidas de detección de resistencias: 1) presentan alta sensibilidad y especificidad, 2) son fáciles de usar y no requieren de equipamiento ni material adicional aparte de los reactivos del kit, 3) son de fácil lectura e interpretación, 4) los resultados están disponibles en 15 min, 5) en el mercado existen ensayos que detectan simultáneamente varios mecanismos de resistencia, 6) suelen ser más económicos que las técnicas moleculares. Comercialmente están disponibles varias pruebas para la detección de carbapenemasas y BLEE. Estos ensayos están validados para trabajar a partir de colonias de microorganismos crecidos en diferentes medios de cultivo, aunque hay estudios que apuntan que se pueden utilizar a partir de un hemo-cultivo positivo. En cuanto a la detección de β -lactamasas directamente a partir de muestras de orina, hay pocos datos disponibles hasta la fecha. Recientemente se ha evaluado el ensayo de NG-Test CTX-M grupo 1 y MULTI directamente a partir de muestras de orina, aplicando el mismo protocolo de la preparación de muestra descrito en el apartado anterior para la identificación directa mediante MALDI-TOF (Figura 7). Aunque cuando se evaluó esta técnica no hubo resultados falsos positivos, sí que se detectaron resultados falsos negativos en comparación con la detección fenotípica convencional, probablemente debido a la presencia de otros tipos de β -lactamasa no incluidos en el ensayo. En resumen, las técnicas basadas en la inmunocromatografía pueden ser muy útiles para la detección de BLEE y carbapenemasas directamente en la muestra, si se toman en cuenta las limitaciones de cada una de ellas y si se tiene en cuenta la epidemiología local en cuanto a los tipos de β -lactamasas circulantes.

Figura 7. Flujo de trabajo para la detección de BLEE del grupo CTX-M mediante una prueba inmunocromatográfica aplicada directamente a la muestra de orina (adaptado del poster de Cuesta *et al.* presentado en el XXIII Congreso de la SEIMC XXIII, con el permiso de los autores)



8.5.2.4 Métodos moleculares

Las técnicas moleculares de detección de resistencias se usan ampliamente en Microbiología. Abarcan desde los métodos caseros de PCR a tiempo final hasta la NGS. La ventaja es que permiten detectar los genes de resistencia en poco tiempo en comparación con las 18 horas necesarias para la mayoría de las técnicas convencionales de los estudios de sensibilidad. Las principales desventajas de técnicas moleculares es que no incluyen ni detectan todos los mecanismos de resistencia y que son más caras. Por lo tanto, su aplicación dependerá de la repercusión clínica y/o epidemiológica que tiene el hecho de detectar ciertos mecanismos de resistencia de manera rápida. Son aplicables tanto a partir de colonias como directamente en la muestra clínica. Así, una vez se obtiene la identificación del microorganismo causante de infección mediante MALDI-TOF, se pueden aplicar al *pellet* bacteriano las pruebas de detección de resistencia disponibles en cada laboratorio en función de la especie identificada y del mecanismo de resistencia a descartar. Algunas de estas técnicas han sido evaluadas a partir de las muestras de orina. Así, Hinić *et al.* evaluaron la técnica de LAMP (Eazyplex® SuperBug CRE) que permite detectar las carbapenemasas de los tipos KPC, VIM, NDM, OXA-48, OXA-181 y CTX-M grupo 1 y 9 a partir de muestras de orina con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 97,9% para la detección de BLEE. Schmidt *et al.* han utilizado el sistema Multiplex Tandem (MT) PCR para detectar 16 genes de resistencia, incluidos los de resistencia a trimetoprim, aminoglucósidos, quinolonas y β -lactámicos, demostrando la misma sensibilidad y especificidad tanto a partir de colonias como a partir del *pellet* obtenido directamente de la muestra de orina. Hay que tener en cuenta que al realizar estas pruebas directamente sobre la muestra puede haber inhibiciones por la presencia de distintas sustancias que interfieren en la reacción. Además, siendo una muestra no estéril es posible detectar genes de resistencia que presentan microorganismos contaminantes. Aun así, tras el proceso de concentración y lavado del *pellet* descrito para la identificación directa, el proceso de detección de resistencia es similar al de realizar esta prueba con colonias crecidas en el cultivo en el caso de infecciones monomicrobianas. A pesar de que las técnicas moleculares son ampliamente usadas para detectar resistencia a antimicrobianos, faltan estudios para demostrar su utilidad a la hora de dirigir el tratamiento de la ITU.

9. INFORMACIÓN DE RESULTADOS

9.1 INFORMACIÓN DE RESULTADOS DE MICROSCOPIA Y DE CITOMETRÍA DE FLUJO

La expresión de los resultados de orina centrifugada habitualmente se realiza como rangos por campo microscópico (por ejemplo, 10-20 leucocitos por campo). Para los leucocitos, hematíes y células epiteliales los resultados se expresan por campo microscópico de 40x (HPF, *High Power Field*). Aunque es una práctica habitual, es más recomendable expresar los resultados por unidad de volumen (por microlitro o por litro). La fórmula que permite la conversión de células por campo en células por unidad de volumen está descrita en el PNT-UR-01 de este procedimiento. Para las células escamosas se acepta reportar los resultados como “escasas”, “algunas” o “abundantes”, aunque es la manera mucho más subjetiva. En el caso de recuentos en cámara cuentaglobulos los resultados se expresan como el número de células por mm^3 .

Los resultados de citometría de flujo se informan por unidad de volumen, que suele ser por microlitro.

9.2 INFORMACIÓN DE RESULTADOS DEL CULTIVO

1. Los cultivos con crecimiento significativo de uno o dos microorganismos se informarán como “Cultivo positivo” y se proporcionará la identificación a nivel de especie y los resultados de antibiograma, así como el recuento en UFC/mL de cada microorganismo.
2. Los cultivos sin crecimiento se informan como “Cultivo negativo” indicando entre paréntesis el límite de detección que dependerá del volumen de orina utilizado para la siembra: “Cultivo negativo ($<10^3$ o $<10^2$ UFC/mL)”. Si se observa crecimiento en recuentos más bajos de los que se consideran significativos de uno o varios microorganismos, el resultado se puede informar como “Crecimiento no significativo”.

3. Los cultivos mixtos, en los que no se trabaja ningún microorganismo se informan como “Se aísla flora mixta. Probable contaminación de la muestra. Recomendamos enviar una nueva muestra, siguiendo las pautas de recogida, si existe indicación clínica”. En el caso de detectar la presencia de varios microorganismos propios del tracto urogenital el resultado se puede informar como “Se aísla microbiota saprófita urogenital. Probable contaminación”.

9.3. INFORMACIÓN DE RESULTADOS DE ESTUDIO DE SENSIBILIDAD

Tal y como se ha explicado en el apartado 8.5.1, los resultados del antibiograma se interpretan de acuerdo con los puntos de corte proporcionados por los organismos competentes, tales como EUCAST o CLSI, el primero de uso obligatorio según el Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAM) de la Agencia Española del Medicamento (AMPS). Recientemente EUCAST ha redefinido las categorías clínicas de S, I y R, manteniendo las abreviaturas. La abreviatura **S** significa que un microorganismo se considera **Sensible**, cuando hay alta probabilidad de éxito terapéutico con el régimen de dosificación estándar del antimicrobiano estudiado. La abreviatura **I** significa que un microorganismo se considera **Sensible**, cuando se incrementa la exposición por ajuste de régimen de dosificación o por su concentración en el lugar de infección. La abreviatura **R** significa que un microorganismo es **Resistente** porque hay una alta probabilidad de fracaso terapéutico incluso cuando hay incremento de la exposición.

El informe final de sensibilidad antibiótica es importante no solo para elegir el antibiótico más apropiado para el tratamiento de la ITU, sino también tiene repercusión en los Programas de Optimización de uso de Antimicrobianos (PROA) tanto de los hospitales como de atención extrahospitalaria y puede prevenir la aparición de resistencias. Para ello el informe debe seguir las siguientes recomendaciones:

1) tener en cuenta las resistencias intrínsecas que no se deben informar, 2) incluir antibióticos de relevancia clínica de cada grupo (por ejemplo, betalactámicos, aminoglucósidos, quinolonas, etc.), 3) informar antibióticos de manera selectiva y secuencial. Este último punto es el más difícil de implementar y requiere adaptaciones en los programas de sensibilidad. Los estudios han demostrado que, aunque la mayoría de los profesionales están de acuerdo con los beneficios de informe selectivo de antimicrobianos, en Europa este procedimiento está implementado de manera parcial y heterogénea. En parte es debido a que EUCAST, a diferencia de CLSI, no ha elaborado por el momento recomendaciones específicas sobre el tema, indicando que estas se realicen por los comités nacionales de cada país, en España el Comité Español del Antibiograma (COESANT). En el documento M100 del CLSI se pueden encontrar tablas donde se agrupan los antimicrobianos en los grupos A, B, C y U, según su inclusión o no en el informe inicial de sensibilidad. La elección de antibióticos a informar depende no solo del espectro (preferencia para los antibióticos de espectro más estrecho activos frente a la cepa estudiada) y del grupo de microorganismos (*Enterobacterales*, estafilococos, enterococos, etc.), sino también de las características del paciente y de la infección en cuestión: foco de infección, edad, embarazo. La necesidad de disponer de datos clínicos relevantes para hacer un informe selectivo adecuado es otro problema con el que se encuentra el microbiólogo clínico. Por esta razón, es crucial tener una buena comunicación entre los clínicos y los microbiólogos y también tener las herramientas informáticas que permitan disponer de información necesaria para elaborar un informe útil y relevante. El informe de sensibilidad debe incluir los antimicrobianos que se usan para el tratamiento empírico en la institución y que deben estar descritos en las guías locales de tratamiento empírico que pueden variar entre distintas instituciones. Entre otras recomendaciones generales se puede citar:

1) incluir siempre antibióticos no betalactámicos en caso de que el paciente sea alérgico a los mismos (por ejemplo, para ITU por *E. faecalis* además de ampicilina informar quinolonas si es ITU no complicada y nitrofurantoina); 2) incluir antibióticos que se puedan dar por vía oral.

En cuanto a la infección urinaria, el informe debe incluir antibióticos como nitrofurantoina, fosfomicina o norfloxacin para los grupos de microorganismos con punto de corte establecido y no se deben informar los macrólidos y clindamicina en cocos Gram-positivos.

10. PAPEL DE LA ORINA PARA EL DIAGNÓSTICO DE OTRO TIPO DE INFECCIONES

10.1 DETECCIÓN DE ANTÍGENOS DE *Streptococcus pneumoniae* y *Legionella pneumophila*

La muestra de orina es útil para el diagnóstico de infecciones producidas por *Streptococcus pneumoniae* y *Legionella pneumophila* serogrupo 1 mediante técnicas rápidas de detección de antígenos (antigenuria). El fundamento de estas técnicas se basa en que las bacterias poseen antígenos solubles que se eliminan por la orina, donde se concentran más que en otros fluidos. La detección se realiza mediante métodos inmunológicos basados en la unión del antígeno-anticuerpo.

En el caso de detección del antígeno de neumococo hay que tener en cuenta que éste se detecta a partir del cuarto día desde el inicio de la clínica, puede seguir detectándose varias semanas e incluso meses tras la infección, puede presentar reacciones cruzadas con estreptococos del grupo *mitis*. Además, no es una prueba útil en las edades tempranas debido a las elevadas tasas de colonización de las vías respiratorias altas por *S. pneumoniae*.

En el caso de detección del antígeno de *L. pneumophila* hay que tener en consideración que el antígeno empieza a detectarse a partir del tercer día desde el inicio de la clínica, puede persistir durante meses después de la infección, y por lo tanto es muy importante que la prueba se solicite en el contexto epidemiológico correspondiente o en casos de neumonías atípicas o graves. La mayoría de las técnicas comercializadas solo detectan el antígeno urinario de *L. pneumophila* serogrupo 1. Ello implica que las neumonías causadas por otros serogrupos o por otras especies de *Legionella* no serán diagnosticadas mediante el test de antigenuria. Finalmente, es importante señalar que siempre que sea posible hay que recoger la muestra de vías respiratorias bajas para el cultivo.

La muestra de orina se debe recoger en un contenedor de orina estándar, en cualquier momento del día y se puede almacenar a temperatura ambiente hasta 24 horas o refrigerada a 2-8°C hasta dos semanas. Las técnicas empleadas para la detección de antigenuria son la inmunocromatografía, el inmunoensayo enzimático y el inmunoensayo fluorescente.

10.1.1 Inmunocromatografía

Las técnicas basadas en inmunocromatografía (ICT) tienen la ventaja de ser fáciles de realizar y de proporcionar los resultados de manera rápida (15 minutos), lo que les hace una excelente herramienta como técnicas *point-of-care*. Hay muchos ensayos disponibles en el mercado: BinaxNOW®, Uni-Gold™, IMMUVIEW®, entre otros. Una de las técnicas mejor evaluadas, BinaxNOW, tiene una sensibilidad de 50-80% en el caso de neumonía neumocócica sin bacteriemia y del 75-85%, si cursa con bacteriemia, mientras que la especificidad es del >95%. En cuanto al antígeno de *L. pneumophila*, todas las técnicas de ICT detectan el antígeno del serogrupo 1. BinaxNOW presenta una sensibilidad de 70-90%, mejorando sustancialmente la sensibilidad si se concentran las muestras de orina. La especificidad es del >97%. La lectura de los ensayos de ICT es visual. Para disminuir el riesgo de errores de interpretación visual y proporcionar los resultados más objetivos, las casas comerciales ofrecen unos instrumentos de lectura de los ensayos, tales como Aleré™ Reader o SKANFLEXI X500. Los ensayos de detección de antígeno de neumococo están validados también para su utilización en muestras de LCR.

10.1.2 ELISA

En la actualidad existen varias técnicas de enzimoimmunoanálisis comercializadas, siendo Binax®, Biotest® y Bartels® las más utilizadas para la detección de antígeno de *L. pneumophila*. La especificidad es del 95-100% y la sensibilidad empleando orina concentrada es similar en los tres ensayos (80-90%, cuando se obtiene precozmente (primera semana de la enfermedad), después disminuye progresivamente). La sensibilidad de Bartels realizada directamente en muestra de orina es del 60-75%. Es capaz de detectar serogrupos diferentes al 1 pero sin una sensibilidad ni especificidad determinada. Los resultados se obtienen en 90 minutos.

10.1.3 Inmunoensayo fluorescente

El inmunoensayo fluorescente (IF) aporta mayor sensibilidad para la detección de antígenos, eliminando además el posible sesgo atribuible a la lectura visual del resultado. Hay dos técnicas disponibles: SOFIA (Quidel) y STANDARD F (SD Biosensor). En ambos casos, la IF presenta una alta especificidad para *S. pneumoniae* y para *L. pneumophila*. STANDARD F permite detectar el antígeno de serotipos diferentes al 1 de *L. pneumophila*. Para realizar las pruebas de IF, se deposita la orina en el pocillo de muestra del casete de prueba. El casete de prueba se coloca dentro del instrumento correspondiente durante un tiempo definido automáticamente o se incuba previamente en la mesa del laboratorio antes de cargarlo para la lectura una vez transcurrido el tiempo de incubación. A continuación, el equipo presenta los resultados analíticos (positivo, negativo o no válido) en la pantalla. Las pruebas de STANDARD F, además de la interpretación del resultado, proporcionan un valor numérico (COI, Cut Off Index). Las técnicas de IF presentan una ventaja de poder conectar los aparatos al LIS, asegurando de esta manera la trazabilidad y minimizando el error humano de introducción manual de resultados. El tiempo hasta el resultado es de 5-15 minutos. Ambas técnicas también están validadas para la detección del antígeno de *S. pneumoniae* en muestras de LCR.

10.2 LEPTOSPIROSIS

Según la OMS cada año se registran más de 500.000 casos de leptospirosis en el mundo con cifras de mortalidad que alcanzan el 10%. Afecta sobre todo las áreas tropicales y subtropicales, y además de casos esporádicos y brotes durante catástrofes naturales, puede considerarse como de riesgo ocupacional para una amplia variedad de actividades laborales y deportivas. El contagio se produce por contacto directo con orina, sangre o tejidos de animales infectados, por contacto con agua o material contaminado. El periodo de incubación varía entre 7 y 26 días. Durante la primera semana se pueden encontrar bacterias en la sangre y en el LCR. En la segunda semana de la infección se puede detectar la respuesta inmunológica de IgM e IgG. Al mismo tiempo las bacterias dejan de detectarse en la sangre y empiezan a excretarse en la orina. Por lo tanto, a partir de la segunda semana y habitualmente hasta un mes después del inicio de los síntomas, la orina se puede utilizar para el diagnóstico de la leptospirosis. Las leptospiras pueden observarse por microscopía en campo oscuro tras un proceso de concentración por centrifugación diferencial. La concentración mínima necesaria para la visualización de leptospiras directamente en muestras de sangre, orina o LCR es de 10.000 bacterias/mL. La sensibilidad de la observación directa es muy baja y los falsos positivos y negativos son frecuentes. Se recomienda realizar el cultivo de orina a partir del 10º día. Las leptospiras son sensibles a la acidez de orina, por lo tanto, el cultivo debe realizarse durante las 2 primeras horas tras su recogida. Se puede sembrar tanto la orina directamente como tras el proceso de centrifugación diferencial (30 min a 1.600 x g o 1 min a 10.000 x g). El proceso de neutralización con bicarbonato sódico previa inoculación del medio de cultivo aumenta la viabilidad de las leptospiras. El medio de cultivo más ampliamente usado es Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH). La temperatura óptima es de 28–30°C y la incubación se suele prolongar hasta 4 meses con controles semanales por microscopía en campo oscuro. Además del cultivo, las técnicas moleculares también se pueden utilizar para el diagnóstico a partir de muestras de orina.

10.3 ESQUISTOSOMIASIS

La esquistosomiasis urinaria está producida por *Schistosoma haematobium*, un parásito que se adquiere cuando las cercarias presentes en el agua atraviesan la piel. Los parásitos adultos viven en los plexos perivesicales y los huevos se eliminan con la orina, pero también pueden quedarse atrapados en los tejidos, provocando una inflamación. *S. haematobium* está presente en África, Oriente Medio y en Córcega. El síntoma más común es la hematuria. La infección crónica no tratada puede causar fibrosis a nivel de uréteres y la vejiga. Una complicación tardía es el cáncer de vejiga. Para el diagnóstico de esquistosomiasis urinaria hay que recoger 100 mL de orina u orina de 24 horas. Se recomienda recoger la muestra entre las 10 y las 15 horas del día después de realizar ejercicio para aumentar la eliminación de huevos.

Hay dos procedimientos principales: por centrifugación y por filtración. En el primer caso, la orina se centrifuga a 2.000 x g durante 2 min y el sedimento se observa en microscopio en busca de huevos. El procedimiento alternativo es usar un dispositivo con un filtro con el poro de 12 a 20 µL. En este caso toda la orina recogida se pasa por el filtro usando una jeringa. A continuación, el filtro se coloca en un portaobjetos, se cubre con un cubreobjetos y se observa al microscopio. Se puede añadir una gota de lugol al sedimento o al filtro antes de colocarlo en microscopio. El principal problema son las bajas tasas de excreción de huevos en orina.

10.4 INFECCIONES VÍRICAS

Muchas infecciones víricas se pueden diagnosticar mediante pruebas, básicamente moleculares, aplicadas a la muestra de orina. En los últimos años la propagación de ciertas infecciones llamadas emergentes, tales como Dengue, Chikungunya, Zika, Ébola, Virus West Nile, etc., han puesto de manifiesto la necesidad de realizar pruebas rápidas y no invasivas para su diagnóstico, tanto para facilitar la recogida de muestras, como para minimizar los riesgos para el personal sanitario. En ciertos casos la eliminación de virus en muestras de orina es más prolongada en comparación con la sangre, lo que permite obtener un diagnóstico etiológico a pesar de que el periodo de viremia haya finalizado. Por otro lado, la combinación de varios tipos de muestras, como pueden ser plasma/suero y orina permite aumentar la sensibilidad diagnóstica. La orina constituye una muestra alternativa para el diagnóstico de ciertas infecciones en la población pediátrica, sobre todo cuando la recogida de muestras invasivas es complicada o simplemente no se puede realizar, por ejemplo, en los países con recursos sanitarios limitados. Aunque los virus se pueden aislar de orina mediante el cultivo en líneas celulares, en las últimas décadas las técnicas de biología molecular han sustituido el cultivo celular en la mayoría de los laboratorios clínicos, ofreciendo resultados más rápidamente y mejorando de manera sustancial la sensibilidad diagnóstica.

Arbovirosis (Zika, Dengue, Virus West Nile)

Las arbovirosis son infecciones transmitidas por artrópodos. Aunque la mayoría de las infecciones cursan de forma asintomática, en algunos casos producen cuadros graves, tales como alteraciones neurológicas en los neonatos de madres infectadas por Zika, fiebre hemorrágica por el virus Dengue o una enfermedad neuro-invasiva producida por el virus West Nile. La mayoría de estas infecciones se diagnostican mediante pruebas serológicas. La PCR puede detectar el virus solo durante el periodo de viremia (habitualmente durante la primera semana después del inicio de la fiebre). En cambio, se ha demostrado que en las muestras de orina el virus se puede detectar hasta 20 días después del inicio de los síntomas, aumentando de esta manera la posibilidad de un diagnóstico etiológico.

Sarampión

El sarampión es una enfermedad aguda, altamente contagiosa, causada por un virus del género *Morbillivirus*. Se caracteriza por fiebre, coriza, conjuntivitis, manchas de Koplik en la mucosa oral y exantema maculopapular generalizado. La infección puede complicarse con otitis media, neumonía, encefalitis e incluso puede causar la muerte. Se transmite directamente de persona a persona por vía aérea, a través de aerosoles, y también por contacto indirecto con las secreciones del enfermo. A pesar de que es una enfermedad prevenible mediante vacunación, en los últimos años se han producido unos brotes importantes. La muestra de orina es la muestra que, juntamente con el exudado faríngeo, se recomienda para el diagnóstico mediante las técnicas moleculares. Se recomienda recoger las muestras antes del 8º día del inicio de exantema.

Parotiditis

El virus de parotiditis pertenece al género de *Rubulavirus*. La infección se transmite por gotas y por contacto y afecta mayoritariamente a la población pediátrica de entre 5 y 14 años. Tan solo 30-40% de infectados desarrollan un cuadro típico caracterizado por la tumefacción de la glándula parotídea, habitualmente bilateral. Las posibles complicaciones incluyen meningoencefalitis, sobre todo están en riesgo las personas adultas, orquitis y epididimitis, que pueden causar la infertilidad, dacrioadenitis, pérdida de audición, miocarditis, tiroiditis, etc. Además de las pruebas serológicas, el diagnóstico microbiológico se basa en la detección de ácidos nucleicos mediante técnicas moleculares. Las muestras recomendadas son saliva y orina.

Adenovirus

Las infecciones por adenovirus afectan tanto la población pediátrica como adulta. Se han descrito más de 50 serotipos de virus, la mitad de ellos pueden causar enfermedad. Las manifestaciones clínicas dependerán del estado inmunológico del paciente, edad, así como del tropismo del virus causante por ciertos órganos y sistemas. Aunque la infección respiratoria es la forma de presentación más frecuente, el virus puede afectar al tracto digestivo, el ojo o el tracto genitourinario, habitualmente en forma de cistitis hemorrágica. En los pacientes inmunodeprimidos los adenovirus pueden causar las infecciones más prolongadas y de mayor gravedad, incluidas las formas diseminadas. La orina es la muestra de elección en las infecciones del tracto genitourinario o cuando hay sospecha de infección diseminada en pacientes inmunodeprimidos.

Citomegalovirus

Citomegalovirus (CMV) pertenece a la familia de *Herpesviridae*. La infección por CMV en un paciente inmunocompetente suele ser asintomática, cursar con un cuadro leve e inespecífico o producir un síndrome mononucleósico. Después de la infección el virus persiste de forma latente en el organismo del huésped. La infección por CMV adquiere una relevancia clínica en dos situaciones:

1) infección congénita y 2) infección en pacientes inmunodeprimidos. En el caso de sospecha de infección congénita la detección de CMV se realiza en la muestra de orina del recién nacido durante los primeros 21 días de vida. Debido a la baja sensibilidad de diagnóstico serológico y la lentitud del cultivo viral, el método más adecuado es la detección de ADN viral mediante PCR. Los pacientes inmunodeprimidos están en riesgo de desarrollar una infección diseminada grave, especialmente en los casos de pacientes trasplantados, en los que la infección puede producirse tanto por transmisión por el donante como por la reactivación del virus propio del paciente. Aunque en las formas diseminadas se puede detectar el virus en las muestras de orina, la muestra más adecuada es la sangre, donde tiene importancia no solo detectar el virus sino cuantificar la carga viral.

Virus BK

El virus BK pertenece a la familia *Polyomaviridae*. La primoinfección suele ocurrir en la infancia, después de que el virus se queda latente en las células de tracto urinario. En los pacientes inmunodeprimidos, sobre todo en trasplantados renales, el virus puede volver a replicarse, causando una nefropatía asociada a poliomavirus BK e incluso una pérdida de injerto. En los pacientes con trasplante de médula ósea el virus BK puede producir una cistitis hemorrágica. La citología de orina revela la presencia de las células *decoy*, que pueden estar presentes tanto en la infección por el virus BK como por el virus JC. La detección de ADN viral mediante PCR en orina y sangre permite diferenciar entre las dos infecciones y cuantificar la carga viral. Una simple presencia de virus en la orina y sangre indican la replicación del virus, pero no confirman la presencia de la nefropatía. El diagnóstico definitivo de nefropatía se realiza mediante una biopsia renal. La monitorización de recuento de células *decoy* en orina junto con la determinación de carga viral en orina y sangre permiten actuar de manera precoz y prevenir el daño renal. La carga viral en orina de $\geq 10^7$ copias/mL y en sangre de $\geq 10^4$ copias/mL indican una nefropatía probable por el virus BK con una sensibilidad y un valor predictivo negativo del 100%, y una especificidad de 92% y 96%, respectivamente.

11. CALIDAD EN LOS ESTUDIOS DE ORINA

Los estudios de orina igual que cualquier otro procedimiento diagnóstico realizado en el laboratorio de Microbiología deben seguir unas recomendaciones de calidad que se recogen en la normativa de calidad ISO vigente durante las fases preanalítica, analítica y postanalítica. Cada laboratorio debe tener el Manual de Calidad, donde se refleja la Política de Calidad establecida en cada centro.

El laboratorio es responsable de la correcta recogida de la muestra y su transporte al laboratorio. Para ello se debe disponer del manual de recogida y transporte de muestras elaborado por el laboratorio y facilitado a todo el personal implicado en el proceso de extracción de muestras. La correcta recogida de la muestra de orina es crucial para el diagnóstico de calidad por el alto riesgo de contaminación con microbiota saprofita urogenital. Las muestras se deben recoger en los recipientes adecuados, estériles, con tapa que asegure el cierre hermético que previene los derrames durante el transporte de las muestras. La calidad

de los envases debe ser asegurada por el fabricante. En el momento de la recepción de la muestra en el laboratorio de Microbiología hay que asegurarse de que las muestras están correctamente etiquetadas, que el contenedor es adecuado al tipo de muestra recogida, que el tipo y la cantidad de muestra son correctos para las pruebas solicitadas, y que se han cumplido las condiciones de transporte necesarias para el procesamiento posterior.

El control de calidad durante el proceso analítico de las muestras de orina incluye, en primer lugar, su correcta inoculación. La inoculación manual tiene una importante variabilidad del inóculo según el ángulo de toma de muestra con asa calibrada. Los sistemas de inoculación automática permiten evitar la variabilidad inter e intra-operador en cuanto al inóculo y tipo de siembra. Se debe asegurar la calidad de los medios de cultivo, tanto comerciales como preparados en el laboratorio. La calidad del proceso analítico también incluye asegurar el correcto funcionamiento de equipos, como las estufas, sembradores automáticos, citómetros de flujo, aparatos automáticos o semiautomáticos de tira reactiva, instrumentos para la realización de antibiograma, etc. Todo el proceso analítico tiene que estar documentado en los correspondientes Procedimientos Normalizados de Trabajo (PNT) de cada laboratorio. Los PNTs deben estar disponibles para todo el personal implicado en el procesamiento de la muestra.

En la fase postanalítica es necesario que los resultados entregados sean precisos y significativos, lo que permite una correcta interpretación de estos y el manejo clínico adecuado de los pacientes. Todas las incidencias, tanto en la fase preanalítica, como en la analítica y postanalítica, deben ser debidamente registradas. Finalmente, los laboratorios deben establecer una serie de controles internos para garantizar el correcto procesamiento de la muestra en cada momento, así como participar en los controles de calidad externos. La frecuencia de los controles internos dependerá de flujo y carga de trabajo de cada laboratorio. Las diferentes sociedades científicas, así como algunas casas comerciales, disponen de controles de calidad externos que se envían periódicamente a los centros participantes para ser contestados en un plazo establecido. Tanto controles internos como externos ayudan a controlar la calidad de los resultados emitidos, así como detectar las deficiencias a corregir.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Andreu A. Pathogenesis of urinary tract infections. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005; 23 (Suppl 4):15-21.
2. Aspevall O, Hallander H, Gant V, Kouri T. European guidelines for urinalysis: a collaborative document produced by European clinical microbiologists and clinical chemists under ECLM in collaboration with ESCMID. *Clin Microbiol Infect*. 2001; 7:173-8.
3. Bonkat G, Pickard R, Bartoletti R, Cai T, Bruyère F, Geerlings SE et al. EAU Guidelines on urological infections. 2018. Disponible en: <https://uroweb.org/wp-content/uploads/EAU-Guidelines-on-Urological-Infections-2018-large-text.pdf>
4. Brubaker L, Wolfe AJ. The female urinary microbiota, urinary health and common urinary disorders. *Ann Transl Med*. 2017; 5:34.
5. Canton R, Loza E, Aznar J, Castillo FJ, Cercenado E, Fraile-Ribot PA, et al. Monitoring the antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms involved in intraabdominal and urinary tract infections recovered during the SMART study (Spain, 2016 and 2017). *Rev Esp Quimioter*. 2019; 32:145-55.
6. De Cueto M, Aliaga L, Alos JI, Canut A, Los-Arcos I, Martínez JA, et al. Executive summary of the diagnosis and treatment of urinary tract infection: Guidelines of the Spanish Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (SEIMC). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017; 35:314-20.
7. Dalet Escribà F. Sedimento urinario. Tratado y atlas. Madrid: Safel. 2000.
8. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing enterobacteriaceae from urine samples by use of the ESBL NDP test. *J Clin Microbiol*. 2014; 52:3701-6.
9. Gallah S, Decre D, Genel N, Arlet G. The beta-Lacta test for direct detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in urine. *J Clin Microbiol*. 2014; 52:3792-4.

10. Gilbert NM, O'Brien VP, Lewis AL. Transient microbiota exposures activate dormant *Escherichia coli* infection in the bladder and drive severe outcomes of recurrent disease. *PLoS Pathog.* 2017; 13:e1006238.
11. Hinic V, Ziegler J, Straub C, Goldenberger D, Frei R. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) detection directly from urine samples with the rapid isothermal amplification-based eazyplex SuperBug CRE assay: Proof of concept. *J Microbiol Methods.* 2015; 119:203-5.
12. LaRocco MT, Franek J, Leibach EK, Weissfeld AS, Kraft CS, Sautter RL, *et al.* Effectiveness of pre-analytic practices on contamination and diagnostic accuracy of urine cultures: a laboratory medicine best practices systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Rev.* 2016; 29:105-47.
13. Malmros K, Huttner BD, McNulty C, Rodriguez-Bano J, Pulcini C, Tangden T. Comparison of antibiotic treatment guidelines for urinary tract infections in 15 European countries: Results of an online survey. *Int J Antimicrob Agents.* 2019; 54:478-86.
14. McCarter YS, Burd EM, Hall GS, Zervos M. CUMITECH 2C. Laboratory Diagnosis of Urinary Tract Infections. Washington, DC.: ASM Press, 2009.
15. McDonald M, Kameh D, Johnson ME, Johansen TEB, Albala D, Mouraviev V. A head-to-head comparative Phase II study of standard urine culture and sensitivity versus DNA next-generation sequencing testing for urinary tract infections. *Rev Urol.* 2017; 19:213-20.
16. McElvania E, Singh K, Specimen collection, transport, and processing: Bacteriology. pp. 302-30. In: Carroll KC, Pfaller MA, Landry ML, McAdam AJ, Patel R, Tichter SS, Warnock DW. (eds). *Manual of Clinical Microbiology.* 12th ed. Washington, DC.: ASM Press, 2019.
17. McGowan CC, Krieger J. Prostatitis, epididimitis, and orchitis. pp. 1381-1387. In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. (eds). *Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases.* 8th ed. Philadelphia: Elsevier; 2015.
18. Merino I, Shaw E, Horcajada JP, Cercenado E, Mirelis B, Pallares MA, *et al.* CTX-M-15-H30Rx-ST131 subclone is one of the main causes of healthcare-associated ESBL-producing *Escherichia coli* bacteraemia of urinary origin in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2016; 71:2125-30.
19. Miller JM, Binnicker MJ, Campbell S, Carroll KC, Chapin KC, Gilligan PH, *et al.* A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clin Infect Dis.* 2018; 67:813-6.
20. Mulvey MA, Klumpp DJ, Stapleton AE. Urinary tract infections. Molecular pathogenesis and clinical management. 2d ed. Washington, DC.: ASM Press, 2017.
21. Nicolle LE, Gupta K, Bradley SF, Colgan R, DeMuri GP, Drekonja D, *et al.* Clinical practice guideline for the management of asymptomatic bacteriuria: 2019 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2019; 68:1611-5.
22. Nienhouse V, Gao X, Dong Q, Nelson DE, Toh E, McKinley K, *et al.* Interplay between bladder microbiota and urinary antimicrobial peptides: mechanisms for human urinary tract infection risk and symptom severity. *PLoS One.* 2014; 9:e114185.
23. Oviano M, Ramirez CL, Barbeyto LP, Bou G. Rapid direct detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in clinical urine samples by MALDI-TOF MS analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2017; 72:1350-4.
24. Pearce MM, Hilt EE, Rosenfeld AB, Zilliox MJ, Thomas-White K, Fok C, *et al.* The female urinary microbiome: a comparison of women with and without urgency urinary incontinence. *MBio.* 2014; 5:e01283-14.
25. Pigrau C. Infecciones del tracto urinario. Madrid: Salvat. 2013.
26. Sathiananthamoorthy S, Malone-Lee J, Gill K, Tymon A, Nguyen TK, Gurung S, *et al.* Reassessment of routine midstream culture in diagnosis of urinary tract infection. *J Clin Microbiol.* 2019; 57.
27. Schaeffer AJ, Nicolle LE. Urinary tract infections in older men. *N Engl J Med.* 2016; 374:2192.
28. Schmidt K, Mwaigwisya S, Crossman LC, Doumith M, Munroe D, Pires C, *et al.* Identification of bacterial pathogens and antimicrobial resistance directly from clinical urines by nanopore-based metagenomic sequencing. *J Antimicrob Chemother.* 2017; 72:104-14.
29. Thomas-White K, Forster SC, Kumar N, Van Kuiken M, Putonti C, Stares MD, *et al.* Culturing of female bladder bacteria reveals an interconnected urogenital microbiota. *Nat Commun.* 2018; 9:1557.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	PNT-UR-01 Procesamiento microbiológico de la orina	PNT-UR-01	
		Edición N° 02	Página 1 de 9

PNT-UR-01

Procesamiento microbiológico de la orina

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2010	Edición inicial
02	2019	Segunda edición

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	PNT-UR-01 Procesamiento microbiológico de la orina	PNT-UR-01	
		Edición N° 02	Página 2 de 9

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir los métodos utilizados para realizar el diagnóstico microbiológico de la infección urinaria. Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de Microbiología Clínica que realicen diagnóstico microbiológico de la infección urinaria.

2. FUNDAMENTO

Las muestras de orina son las más numerosas de los laboratorios de microbiología. El objetivo del análisis microbiológico de la orina consiste en diagnosticar infecciones del tracto urinario (ITU) mediante una serie de procedimientos. Aunque el urocultivo sigue siendo el patrón de oro para el diagnóstico de ITU, otros análisis, tales como la tira reactiva o el análisis de sedimento urinario aportan una información adicional y además se pueden utilizar para el cribado de muestras de orina. La correcta interpretación de los resultados del cultivo requiere disponer de la información sobre la sintomatología del paciente, su edad y género, así como la técnica de recogida de la muestra.

En algunos laboratorios, que reciben un gran número de muestras de orina, se realizan técnicas de cribado para disminuir la carga de trabajo. Estas técnicas incluyen la microscopía manual y automatizada y la citometría de flujo. Los principales parámetros que se usan para el cribado son la presencia de leucocitos y de bacterias.

En este documento se describe el procedimiento de preparación de la muestra para el análisis microscópico de orina, examen mediante citometría de flujo y el procesamiento de la muestra para urocultivo. Las técnicas de estudio de sensibilidad a los antimicrobianos de patógenos urinarios no difieren de los que se aplican a microorganismos aislados de otros focos y están descritos en el Procedimiento SEIMC 11. "Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos" (2000) y sus PNTs correspondientes, así como en el PNT-UR-02 del anterior Procedimiento SEIMC 14a. "Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinario", 2011.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. García-Lechuz Moya JM, González López JJ, Orta Mira N, Sánchez Romero MI. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero MI (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2017.
2. Manuales de los equipos de citometría de flujo.

4. MUESTRAS

Muestras de orina obtenidas por uno de los siguientes métodos:

- Orina de micción espontánea
- Sonda permanente, nefrostomía, ureterostomía
- Orina obtenida por sondaje vesical
- Punción suprapúbica
- Bolsas colectoras adhesivas infantiles
- Otras (cistoscopia, punción renal, etc.)

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	PNT-UR-01 Procesamiento microbiológico de la orina	PNT-UR-01	
		Edición N° 02	Página 3 de 9

Estas muestras se recogerán según las técnicas descritas en el apartado 7.1 “Obtención de muestras” de este procedimiento. El volumen de la muestra y las condiciones de transporte y conservación están descritos en los apartados 7.2 y 7.3 de este procedimiento, así como en el documento SEIMC 1b. “Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología”, 2017. De modo general, las muestras deben enviarse al laboratorio lo antes posible, en un plazo máximo de dos horas desde su obtención. En el caso de que el procesamiento no pueda llevarse a cabo de forma inmediata, la muestra se conservará a 2-8°C hasta su procesamiento y nunca más de 24 horas tras la obtención.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

5.1. TIRAS DE ORINA

No se requieren reactivos

5.2. EXAMEN MICROSCÓPICO EN FRESCO

No se requieren reactivos

5.3. EXAMEN MICROSCÓPICO DE LA MUESTRA TEÑIDA

Reactivos para la tinción de Gram

- Cristal violeta
- Solución de Iugol
- Alcohol-acetona
- Fucsina o safranina. La contracoloración con fucsina tiñe más intensamente que la safranina y permite distinguir mejor los elementos celulares (leucocitos, hematíes y células de descamación epitelial), pero produce más precipitados y es más tóxica.

5.4. CITOMETRÍA DE FLUJO

UF Cellsheath
 UF Cellpack CR
 UF Cellpack SF
 UF Fluorocell CR
 UF Fluorocell SF
 Agua destilada
 UF control H y UF control L

5.5 CULTIVO

Medios de cultivo (Agar sangre, Agar MacConkey, Agar CLED, medios cromogénicos)

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	PNT-UR-01 Procesamiento microbiológico de la orina	PNT-UR-01	
		Edición N° 02	Página 4 de 9

6. APARATOS Y MATERIAL

6.1. TIRAS DE ORINA

- Tiras reactivas comercializadas. Las tiras se conservarán de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- Analizador automático o semiautomático (espectrofotómetro de reflectancia).

6.2. EXAMEN MICROSCÓPICO EN FRESCO

- Microscopio de campo claro y contraste de fases con aumentos de 100x y 400x (objetivos de 10x y 40x con oculares de 10x). Para la mejor visualización de los hematíes y de los cilindros (cilindros leucocitarios y bacterianos en pielonefritis) se recomienda usar el contraste de fases.
- Tubos estériles para 7-12 mL de plástico de fondo cónico o redondo. Se recomienda el uso de tubos aferrados con marcas del volumen.
- Pipetas Pasteur
- Centrífuga
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Cámara de Neubauer o de Fuchs-Rosenthal

6.3. EXAMEN MICROSCÓPICO DE LA MUESTRA TEÑIDA

- Microscopio de campo claro con aumentos 100x, 400x e inmersión 1000x (objetivos de 10x, 40x y 100x con oculares 10x)
- Aparato para la tinción automatizada (opcional)
- Portaobjetos

6.4. CITOMETRÍA DE FLUJO

UF-100, UF-500 o UF-1000 de Sysmex

6.5. CULTIVO

- Estufa de aire de 35-37°C
- Estufa de CO₂ de 35-37°C o material para obtener condiciones de CO₂ (contenedores o paquetes herméticos, sistema de generación de CO₂ (sobres o aparatos))
- Asas estériles de 10 µL y/o 1 µL

7. PROCEDIMIENTO

7.1. PROCEDIMIENTO PARA LA LECTURA DE LAS TIRAS DE ORINA

- Se introduce la tira en la muestra de orina hasta mojarla completamente durante un segundo.
- Se desprecia el exceso de orina.
- Se espera el tiempo de reacción según las instrucciones del fabricante.
- Se lee y se compara con los colores patrón suministrados por el fabricante.
- Si se utiliza un espectrofotómetro, la lectura es automática.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	PNT-UR-01 Procesamiento microbiológico de la orina	PNT-UR-01	
		Edición N° 02	Página 5 de 9

7.2. PROCEDIMIENTO PARA EL EXAMEN MICROSCÓPICO EN FRESCO

Se puede examinar la orina sin centrifugar en cámaras de Fuchs-Rosenthal o Neubauer (no desechables) o Kova u otras de plástico (desechables).

En muchos laboratorios se realiza el examen de orina centrifugada, aunque el proceso de centrifugación puede alterar ligeramente algunos elementos formes y es más difícil de estandarizar. Para ello, la orina se agita para conseguir una correcta homogeneización, se toma una cantidad conocida, entre 7 y 12 mL, que se vierte en un tubo. Es conveniente que el tubo esté graduado, para poder enrasar el volumen inicial correcto, y también el volumen final.

En cada laboratorio se debe estandarizar el procedimiento para que todas sus mediciones sean comparables. Se busca concentrar la orina 10-20 veces.

Se centrifugan 7-12 mL de orina a 400 x g durante 3-5 minutos.

El factor de dilución puede ser de 1/10 o 1/20, lo que correspondería a 1 o 0,5 mL, si se parte de 10 mL. Se recomienda extraer el sobrenadante con pipeta, y resuspender en el volumen determinado.

7.3. PROCEDIMIENTO PARA EL EXAMEN MICROSCÓPICO DE LA MUESTRA TEÑIDA

Se recomienda realizar en orina sin centrifugar. Se disponen 10 µL de orina homogeneizada en un portaobjetos, se deja secar, se tiñe con la tinción de Gram y se examina a 1000x con objetivo de inmersión. Se estima que la presencia de uno o más microorganismos por campo de 1000x se correlaciona con los recuentos de 10⁵ UFC/mL.

7.4. PROCEDIMIENTO PARA LA CITOMETRÍA DE FLUJO

- Asegurarse de que el citómetro tiene todos los reactivos necesarios para realización del análisis. Sustituir los reactivos en caso necesario, siguiendo el procedimiento descrito en el manual del equipo.
- Pasar los controles de calidad interno, UF control H y UF control L. Es necesario hacerlo una vez al día antes de usar el citómetro.
- En caso de realizar el análisis automático de la muestra, se coloca el tubo de orina en un rack y se introduce el rack en la zona destinada para ello del citómetro. Las muestras que llevan el código de barras serán identificadas automáticamente y se les asignará la posición en el rack utilizado. Alternativamente, se pueden identificar las muestras de forma manual, indicando el número de la muestra y la posición en el rack correspondiente.
- En caso de realizar el análisis manual, poner 1 mL de orina en un tubo de 1,5 mL, introducir el número de muestra y realizar el análisis.

7.6.5. PROCEDIMIENTO PARA EL CULTIVO

La siembra de la orina se realiza de manera cuantitativa y para ello se usan asas calibradas de 1 µL o de 10 µL. Si se siembran 10 µL, una colonia aislada en cultivo corresponde al recuento de 100 UFC/mL, mientras que si se utiliza el asa de 1 µL una colonia crecida en medio de cultivo corresponde a un recuento de 1.000 UFC/mL.

Es importante realizar la técnica de siembra de manera correcta y homogénea para disminuir la variabilidad en el volumen de muestra que se inocula. Primero se agita la muestra, para homogeneizarla. Seguidamente, se introduce el asa de forma vertical en la muestra de orina y se retira. En estas condiciones, la cantidad que queda en el asa es la que corresponde a la calibración. La siembra cuantitativa consiste en tocar con el

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	PNT-UR-01 Procesamiento microbiológico de la orina	PNT-UR-01	
		Edición N° 02	Página 4 de 9

asa cargada de orina la placa de medio de cultivo y realizar una estría a través del centro del agar y luego extender el inóculo en ángulos rectos respecto a la estría primaria. A continuación, la placa se gira 90° y el inóculo se extiende hasta cubrir toda la superficie. Otro tipo de siembra que se usa ampliamente en los laboratorios de Microbiología es la siembra por agotamiento, que no permite la cuantificación exacta, pero tiene la ventaja de poder discernir con precisión la abundancia relativa de cada tipo de colonia, lo que resulta muy útil en infecciones mixtas o en muestras contaminadas. Desde el punto de vista práctico se pueden combinar las dos técnicas de siembra, usando la mitad de la placa para el cultivo cuantitativo y la otra mitad para agotar y aislar las colonias que se van a utilizar para identificación y el estudio de sensibilidad antibiótica. Sea cual sea la técnica de siembra, es importante que permita realizar la cuantificación del inóculo de microorganismos causantes de ITU. No es aceptable la siembra de más de una muestra de orina por placa. Dependiendo de las características de cada institución, se pueden utilizar diferentes combinaciones de los medios de cultivo indicados, aunque siempre se debe utilizar un medio rico no selectivo.

La mayoría de las infecciones urinarias están producidas por microorganismos que crecen en 18 horas. Sin embargo, en ciertos grupos de pacientes, con patología urológica y renal de base o en los pacientes con el urocultivo convencional negativo y que no mejoran de los síntomas urinarios tras el tratamiento antibiótico, el cultivo puede precisar una incubación más prolongada (hasta 48 horas).

Las placas de agar sangre y agar chocolate se incubarán a 35-37° en atmósfera rica en CO₂. El medio CLED, los medios cromogénicos y el agar MacConkey se incuban a 35-37° en aerobiosis.

En casos seleccionados, tal y como se ha mencionado antes, serán necesarias otras atmósferas de incubación.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

8.1 Tira reactiva

Los resultados de la tira reactiva incluyen muchos parámetros. Para el diagnóstico de la infección sobre todo tienen importancia los siguientes: nitritos (positivos/negativos), esterasa leucocitaria (se informa como leucocitos/ μ L), sangre (hematíes/ μ L).

8.2 Examen microscópico

A. Los principales parámetros que informar en el caso de ITU son: leucocitos, hematíes y células escamosas. También es posible observar los cilindros leucocitarios o bacterianos o mixtos en el caso de pielonefritis.

Todas las guías internacionales recomiendan expresar los resultados en forma de células por μ L. Sin embargo, en muchos laboratorios y libros de texto se continúa usando el promedio o el rango de partículas por campo. Se entiende que LPF (*Low Power Field*) se corresponde al objetivo de 10x y ocular 10x (100 aumentos) y el HPF (*High Power Field*) al objetivo de 40x y ocular de 10x (400 aumentos). Los hematíes, los leucocitos y las células epiteliales se cuantifican por campo de 400x (HPF). Los cilindros se cuantifican por campo de 100x (objetivo de 10x, LPF).

Para convertir el número de células/HPF en el número de células/ μ L, se procede como se indica a continuación. Primero se debe calcular el volumen del líquido observado por campo microscópico (volumen del campo). Para ello se calcula el campo de visión, que es el diámetro ocular (mm) dividido por aumentos del

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	PNT-UR-01 Procesamiento microbiológico de la orina	PNT-UR-01	
		Edición N° 02	Página 4 de 9

objetivo. Por ejemplo, para el objetivo de 40x y el ocular de 20 mm, el campo de visión es de 0,5. La profundidad del campo entre portaobjetos y cubreobjetos es de 0,04 mm. La fórmula para calcular el volumen del campo (μL) es la siguiente:

$$\text{Volumen del campo } (\mu\text{L}) = 0,04 \text{ mm} \times \pi \times \left(\frac{\text{el campo de visión}}{2}\right)^2$$

Con esta fórmula se puede confeccionar una hoja de cálculo, en la que se pueden introducir las características de cada microscopio del laboratorio, el factor de concentración de la orina (generalmente 1/20) y así poder informar los resultados de manera uniforme, en forma de células por μL . Por ejemplo, si concentramos 10 mL de orina hasta 0,5 mL (1/20) y usamos el objetivo de 40x y el ocular de 20 mm, el volumen del campo, aplicando la fórmula, es $0,04 \times \pi \times (0,5/2)^2 = 0,0078 \mu\text{L}$. Entonces, si la orina está concentrada a 1/20, un campo a 40x corresponde a $0,0078 \times 20 = 0,156 \mu\text{L}$ de orina original. Si observamos 5 leucocitos por campo, estos corresponden a $5 / 0,156 = 32$ leucocitos por μL .

A pesar de que el examen del sedimento centrifugado puede detectar la presencia de microbiota bacteriana, el hecho de informar la presencia de bacterias sin poder proporcionar ningún dato más (microbiota mixta o no, microbiota Gram-positiva o Gram-negativa, recuento aproximado, etc.) sólo puede crear confusión. Para informar la presencia de microorganismos hay que realizar la tinción de Gram.

En el caso de que los recuentos se realicen en una cámara utilizada para recuento de leucocitos, los resultados se expresan como el número de células por mm^3 .

B. En la tinción de Gram se informará la presencia de microorganismos y su morfología, por ejemplo “No se observan microorganismos” o “Se observan bacilos Gram negativos”. Este estudio puede solicitarse expresamente en casos concretos, por ejemplo, ante la sospecha de sepsis de origen urinario. Se debe informar al clínico solicitante sobre las limitaciones de la técnica (solo detecta microorganismos cuando están presentes en recuentos $\geq 10^4$ - 10^5 UFC/mL).

C. Citometría de flujo. Proporciona el recuento de partículas y células detectadas por μL . En caso de que la citometría de flujo se utilice para el cribado de orinas, cada centro debe establecer sus propios puntos de corte según la población atendida. Tal y como se indica en el apartado 8.1.4 “Evaluación de las técnicas empleadas para el cribado de orinas” de este procedimiento, el punto de corte puede variar según las características del paciente, criterios de urocultivo positivo, sensibilidad y valor predictivo negativo buscados, etc. Tanto si la técnica se usa para el cribado, como si no, se informarán los recuentos de leucocitos/ μL , hematíes/ μL , células epiteliales/ μL y bacterias/ μL . Otros parámetros, como los cilindros leucocitarios o levaduras, necesitan una revisión previa por imagen (si se dispone del módulo de imagen, UD de Sysmex) o al microscopio antes de informarlos.

En el caso de usar la citometría de flujo como método de cribado, las muestras con los recuentos de bacterias y/o leucocitos inferiores al punto de corte establecido se informarán como: “Cultivo no indicado por ausencia de bacteriuria significativa”.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	PNT-UR-01 Procesamiento microbiológico de la orina	PNT-UR-01	
		Edición N° 02	Página 5 de 9

8.3 Cultivo

En la **Tabla 1** se resumen las recomendaciones en cuanto a la interpretación del urocultivo, haciendo hincapié en que estas recomendaciones se deben valorar en función de la información clínica disponible, que ningún criterio es absoluto y que todas las muestras pueden merecer una atención especial y que, en este caso, se pueden modificar los criterios generales de interpretación que hayan sido adaptados.

Tabla 1. Criterios de interpretación de resultados de urocultivos.

Tipo de muestra y paciente	Resultado significativo	Parámetros adicionales a valorar	Resultado probablemente no significativo	Informe/comentarios para el resultado significativo
OPS, cistoscopia, punción renal	Cualquier recuento	Piuria	Microbiota saprófita (contaminación por reflujo durante la aspiración)	Cultivo positivo (ID a nivel de especie y antibiograma)
OME, mujer	≥ 100 UFC/mL*	Piuria, cilindros leucocitarios, tinción de Gram con microorganismos intraleucocitarios	Cultivo polimicrobiano Microbiota saprófita Presencia de abundantes células escamosas	Cultivo positivo (ID a nivel de especie y antibiograma)
OME, varón	≥ 1.000 UFC/mL	Piuria, cilindros leucocitarios, tinción de Gram con microorganismos intraleucocitarios	<1.000 UFC/mL Cultivo polimicrobiano Microbiota saprófita	Cultivo positivo (ID a nivel de especie y antibiograma)
OSV	≥ 100 UFC/mL	Piuria	Flora saprófita (contaminación durante el procedimiento) Ausencia de piuria	Cultivo positivo (ID a nivel de especie y antibiograma)
Sonda permanente	≥ 1.000 UFC/mL Puede haber varios microorganismos	Piuria	Cultivo polimicrobiano en paciente asintomático Ausencia de piuria	Cultivo positivo (ID a nivel de especie y antibiograma). Los cultivos polimicrobianos, se informan como "cultivo mixto" y se recomienda recoger una nueva muestra tras el recambio de sonda.
OME, para diagnóstico de BA	≥ 100.000 UFC/mL 2 urocultivos con el mismo patógeno para mujeres 1 urocultivo para hombres	Puede presentarse con o sin piuria	<100.000 UFC/mL Cultivo polimicrobiano	Cultivo positivo (ID a nivel de especie y antibiograma)

m/o, microorganismo; OME, orina de micción espontánea; OSV, orina obtenida por sondaje vesical; OPS, punción suprapúbica; BA, bacteriuria asintomática; ID, identificación a nivel de especie

*Sólo se pueden valorar recuentos bajos si se siembran 10 μ L y si se dispone de información clínica (mujer joven con síntomas de cistitis).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	PNT-UR-01 Procesamiento microbiológico de la orina	PNT-UR-01	
		Edición N° 02	Página 4 de 9

1. Los cultivos con crecimiento significativo de uno o dos microorganismos se informarán como “Cultivo positivo” y se proporcionará la identificación a nivel de especie y los resultados de antibiograma, así como el recuento en UFC/mL de cada microorganismo.
2. Los cultivos sin crecimiento se informan como “Cultivo negativo” indicando entre paréntesis el límite de detección que dependerá del volumen de orina utilizado para la siembra: “Cultivo negativo (<math><10^3</math> o <math><10^2</math> UFC/mL)”. Si se observa crecimiento en recuentos más bajos de los que se consideran significativos de uno o varios microorganismos, el resultado se puede informar como “Crecimiento no significativo”.
3. Los cultivos mixtos, en los que no se trabaja ningún microorganismo se informan como “Se aísla flora mixta. Probable contaminación de la muestra. Recomendamos enviar una nueva muestra, siguiendo las pautas de recogida, si existe indicación clínica”. En el caso de detectar la presencia de varios microorganismos propios del tracto urogenital el resultado se puede informar como “Se aísla microbiota saprófita urogenital. Probable contaminación”.

9. RESPONSABILIDADES

El procedimiento puede llevarse a cabo por personal técnico o facultativo del laboratorio. Para ello dicho personal debe tener conocimientos sobre la base teórica del ensayo y estar entrenado para realizar el procedimiento. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el facultativo especialista responsable.

Todo el personal del laboratorio de Microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento elaborado por el laboratorio de Microbiología.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de Microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento elaborado por el laboratorio de Microbiología.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

En el caso de usar las técnicas de cribado, hay que tener en cuenta las sensibilidad, especificidad y valores predictivos de los puntos de corte establecidos, así como las limitaciones de cada técnica en concreto.

Tal y como se ha expresado anteriormente en el texto, la interpretación de los resultados de urocultivo es complicada y ningún criterio es absoluto. Las recomendaciones recogidas en este documento deben ser consideradas junto con los datos clínicos disponibles de cada paciente.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. European Confederation of Laboratory Medicine. European urinalysis guidelines. Scand J Clin Lab Invest Suppl. 2000; 231:1-86.
2. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. Washington, DC.: ASM Press, 2007.
3. Pigrau C. Infecciones del tracto urinario. Editorial Salvat. Madrid 2013.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico microbiológico de la prostatitis bacteriana crónica	PNT-UR-03	
		Edición N° 02	Página 1 de 6

PNT-UR-03

Diagnóstico microbiológico de la prostatitis bacteriana crónica

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2010	Edición inicial
02	2019	Segunda edición

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico microbiológico de la prostatitis bacteriana crónica	PNT-UR-03	
		Edición Nº 02	Página 2 de 6

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El propósito del presente documento es definir los métodos utilizados para realizar el diagnóstico microbiológico de la prostatitis bacteriana crónica, así como definir los criterios de interpretación de los cultivos y de las técnicas moleculares. Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de microbiología clínica que realicen diagnóstico microbiológico de la prostatitis bacteriana crónica o envíen muestras a laboratorios de referencia.

2. FUNDAMENTO

La prostatitis bacteriana crónica es una entidad frecuente en varones. El diagnóstico microbiológico es complejo dada la inaccesibilidad de la próstata y la frecuente contaminación de la secreción prostática con la microbiota uretral. El porcentaje de casos confirmados por cultivo es mucho más bajo que en la prostatitis aguda.

La recogida de muestras requiere seguir métodos establecidos para poder alcanzar el diagnóstico de localización de la infección. El procesamiento correcto y una valoración adecuada de los resultados son esenciales para conseguir el diagnóstico y el éxito terapéutico.

El método de Meares-Stamey, descrito en 1968, permite establecer si la infección está localizada en la vejiga o en la próstata. Se basa en realizar cultivos cuantitativos de diferentes fracciones de la orina y de la secreción prostática o semen.

Para el cultivo cuantitativo es imprescindible utilizar los métodos y medios adecuados que permitan la detección de los principales agentes etiológicos implicados en la prostatitis crónica, fundamentalmente, *Escherichia coli* y otras Enterobacterales, *Pseudomonas aeruginosa* y enterococos.

El diagnóstico de la prostatitis crónica también requiere la demostración de inflamación prostática, para lo que es necesario realizar recuentos de leucocitos en las distintas muestras obtenidas y compararlos.

No está del todo claro el papel de *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma genitalium* como agentes causales de prostatitis crónica. Sin embargo, como parte del diagnóstico microbiológico, se recomienda incluir técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, especialmente PCR en tiempo real, que permitan su detección.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- García-Lechuz Moya JM, González López JJ, Orta Mira N, Sánchez Romero MI. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero MI (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2017.
- Meseguer Peinado MA, Acosta Boga B, Codina Grau MG, Matas Andreu L. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Mycoplasma* spp. y *Ureaplasma* spp. 2011. 40. Meseguer Peinado MA (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2011.
- Galán Montemayor JC, Lepe Jiménez JA, Otero Guerra L, Serra Pladevall J, Vázquez Valdés F. Diagnóstico microbiológico de las infecciones de transmisión sexual y otras infecciones genitales. 2019. 24a. Vázquez Valdés F (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2019
- Alados Arboledas JC, Gómez García de la Pedrosa E, Leiva León J, Pérez Sáenz JL, Rojo Molinero E. Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. 10a. Pérez Sáenz JL (coordinador). Procedimientos

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico microbiológico de la prostatitis bacteriana crónica	PNT-UR-03	
		Edición Nº 02	Página 3 de 6

en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2014.

4. MUESTRAS

Las muestras de orina a recoger deben ser las primeras de la mañana, o bien, después de 3 a 5 horas desde la última micción. Para evitar la contaminación, el paciente debe obtener las muestras de orina re-trayendo la piel del prepucio.

La prueba requiere la obtención de 4 muestras:

Muestra 1, "orina uretral", se recogen 5-10 mL de la primera parte de la micción en un contenedor estéril, identificado con el número 1.

Muestra 2, "orina vesical", en otro contenedor se recogen 5-10 mL de orina de micción media. El contenedor debe identificarse con el número 2.

Muestra 3, secreción prostática, la muestra debe obtenerla un especialista tras la realización de un masaje prostático por vía transrectal. La muestra se recogerá en un contenedor estéril identificado como "secreción prostática". La muestra de secreción prostática puede sustituirse por una muestra de semen obtenido por el propio paciente. En este caso, el contenedor de la muestra debe rotularse como "semen".

Muestra 4, "orina post-masaje", se recogen 5-10 mL de orina después de realizar el masaje prostático en un contenedor identificado con el número 4.

Si se realiza la técnica simplificada de Nickel, es suficiente con obtener 2 muestras de orina:

Muestra 1, "orina pre-masaje prostático": en un contenedor estéril de boca ancha identificado como 1, se recogen los primeros 5-10 ml de orina emitida espontáneamente.

Muestra 2, "orina post-masaje prostático": tras un masaje prostático realizado por vía transrectal por un especialista, se recogen los primeros 5-10 ml de orina emitida espontáneamente. La orina se recoge en un contenedor estéril que debe identificarse con el número 2.

Las muestras de orina, semen y secreción prostática se recogerán en contenedores estériles sin conservantes.

4.1. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN

Una vez obtenidas las diferentes muestras deben enviarse al laboratorio lo antes posible, en un plazo máximo de dos horas desde su obtención. Las muestras se procesarán inmediatamente tras su llegada al laboratorio. Aunque no es deseable, en el caso de que el procesamiento no pueda llevarse a cabo de forma inmediata, la muestra se conservará a 2-8°C hasta su procesamiento y nunca más de 24 horas tras la obtención.

4.2. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

El manejo de la muestra a su llegada al laboratorio implica el cumplimiento de los criterios de calidad de la muestra, indicados en el Procedimiento de Microbiología Clínica SEIMC 1b: "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología". Ante este tipo de muestras clínicas, "irrepetibles", en caso de no cumplirse los criterios de calidad establecidos por el laboratorio, se consultará siempre con el clínico responsable de la solicitud, para solventar cualquier duda o problema preanalítico. Si finalmente se indica el procesamiento de la muestra, se hará constar la incidencia producida en el informe de resultados.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico microbiológico de la prostatitis bacteriana crónica	PNT-UR-03	
		Edición N° 02	Página 4 de 6

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Medios de cultivo que permitan el crecimiento de los uropatógenos.
- Sistemas comerciales generadores de atmósfera específica (5-7% CO₂).
- Reactivos para realizar técnicas de amplificación de ácidos nucleicos para la detección de *C. trachomatis* y *M. genitalium*.

6. APARATOS Y MATERIAL

- Cámara de Neubauer.
- Centrífuga de sobremesa.
- Microscopio óptico.
- Estufa de aerobiosis 35-37°C.
- Jarras de incubación o estufa de CO₂.
- Asas de 10 µL.
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Cabina de bioseguridad tipo II.
- Sistema comercial para realización de técnicas moleculares para detección de *C. trachomatis* y *M. genitalium*.

7. PROCEDIMIENTO

7.1. Examen microscópico

Debe realizarse un examen microscópico para cuantificar el número de leucocitos presentes en cada una de las muestras. El recuento se realiza de cada una de las muestras sin centrifugar en una cámara de recuento, o bien, pueden observarse los leucocitos en las muestras de orina tras centrifugación determinando en el sedimento el número de leucocitos por campo (400x), así como en una gota de la secreción prostática o semen. Sin embargo, el recuento de leucocitos en orina centrifugada es poco reproducible y siempre que sea posible, debe determinarse el número de leucocitos por mm³, que es mucho más fiable.

7.2. Cultivo

El procesamiento de las muestras se realizará en una cabina de bioseguridad tipo II. Cada una de las muestras se siembra en los siguientes medios:

- Agar sangre
- Agar MacConkey o un medio cromogénico para uropatógenos

Cada muestra se siembra con un asa calibrada de 10 µL en los medios de cultivo indicados extendiéndola por toda la superficie de la placa para poder realizar un recuento de colonias. De este modo, el límite de detección es de 10² UFC/mL. El medio de agar sangre se incuba a 35°-37°C en atmósfera con un 5% de CO₂ y la lectura se realiza a las 24 y 48 horas. El agar MacConkey y el medio cromogénico se incuban a 35°-37°C en aerobiosis y se leen tras 24 horas de incubación.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico microbiológico de la prostatitis bacteriana crónica	PNT-UR-03	
		Edición N° 02	Página 5 de 6

7.3. Lectura de los cultivos e identificación de microorganismos

Si se observa crecimiento, realizar las pruebas de identificación y de sensibilidad a los antibióticos según las normas estandarizadas (EUCAST, CLSI). Los agentes causales más frecuentes de prostatitis crónica son *E. coli* y otras *Enterobacterales*, *P. aeruginosa* y enterococos. Es muy dudoso el valor de estreptococos y estafilococos como agentes causales de prostatitis y cuando se encuentran en los cultivos, generalmente representan una contaminación.

7.4. Técnicas moleculares

Para la detección de *M. genitalium* y *C. trachomatis*, se emplean generalmente sistemas comerciales que utilizan técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, sobre todo PCR múltiple en tiempo real. Las muestras adecuadas son la primera fracción de la orina (orina uretral) y la orina post-masaje. La detección *M. genitalium* y *C. trachomatis* en muestras de semen y secreción prostática es complicada por las características de estas muestras y son frecuentes los problemas por extracción deficiente de ácidos nucleicos y por inhibición de la PCR.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Los resultados se expresan en términos cuantitativos.

Los resultados del recuento de leucocitos se expresarán como “número de leucocitos por mm³” o “número de leucocitos por campo”.

Se considera que existe inflamación de la glándula prostática cuando se observan leucocitos en la secreción prostática, orina post-masaje o semen y el recuento es superior al encontrado en la orina uretral y en la orina de micción media.

Los resultados del cultivo se expresarán en todas las muestras como: “se aíslan: número de UFC/mL”.

Se considera que existe una prostatitis cuando el recuento de bacterias es diez veces superior en la secreción prostática, semen u orina post-masaje que en la muestra de orina uretral o vesical.

Un recuento de bacterias en la orina de micción media, superior al obtenido en la secreción prostática o en la orina post-masaje traduce una cistitis. También los recuentos elevados, similares en todas las muestras, posiblemente traducen una cistitis, aunque no puede descartarse una prostatitis concomitante. Un recuento elevado de bacterias en la primera muestra sin crecimiento significativo en el resto de las muestras representa una colonización de uretra distal. Pueden presentarse muchas combinaciones posibles y, en ocasiones, es difícil la interpretación de los resultados.

Los resultados de las técnicas moleculares para detección de *C. trachomatis* y *M. genitalium* deben expresarse como:

Detectado: para un resultado reactivo de la prueba.

No detectado: para un resultado no reactivo de la prueba.

Inhibición: cuando la presencia de inhibidores en la muestra impide la amplificación.

Cuando se detecta alguno de estos patógenos únicamente en la orina post-masaje puede hacerse un diagnóstico de prostatitis; cuando se detectan en la orina uretral y orina post-masaje, puede tratarse de una uretritis o una prostatitis y para realizar el diagnóstico de localización es necesario valorar conjuntamente los resultados microbiológicos, los datos clínicos y analíticos, el tacto rectal y las técnicas de imagen.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico microbiológico de la prostatitis bacteriana crónica	PNT-UR-03	
		Edición N° 02	Página 6 de 6

9. RESPONSABILIDADES

El proceso de recogida de la muestra es responsabilidad de los clínicos y servicios solicitantes. La información sobre las normas de recogida, transporte y conservación de las muestras es responsabilidad del laboratorio de Microbiología.

La responsabilidad de los técnicos y facultativos deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el Facultativo Especialista Responsable de la Unidad del Laboratorio de Microbiología que los emite.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de Microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de Microbiología.

Las pruebas están basadas en distintos principios técnicos que han ido evolucionando con el tiempo, la experiencia adquirida y las recomendaciones nacionales e internacionales. A pesar de los avances logrados en la clasificación de las prostatitis y en los métodos diagnósticos, la valoración de los resultados no siempre es clara y debe ser realizada por un microbiólogo experto en el tema.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Tanto el método de Meares y Stamey como el de Nickel tienen una baja sensibilidad para diagnosticar la prostatitis crónica bacteriana. Sólo en aproximadamente un 14% de las prostatitis crónicas bacterianas se demuestra la etiología.

Cuando en las muestras previas al masaje se obtiene un crecimiento bacteriano significativo no es posible distinguir una cistitis simple de una cistitis asociada a prostatitis crónica.

El papel de *C. trachomatis* y *M. genitalium*, como agentes causales de prostatitis crónica no está del todo claro. Como se ha señalado previamente, el diagnóstico de prostatitis sólo puede establecerse cuando estos patógenos se detectan únicamente en la orina post-masaje; sin embargo, cuando se detectan en la muestra uretral y post-masaje, puede tratarse de una uretritis o una prostatitis y el diagnóstico de localización sólo puede establecerse valorando conjuntamente los datos clínicos, analíticos, tacto rectal y las técnicas de imagen.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. McElvania E, Singh K, Specimen collection, transport, and processing: Bacteriology. pp. 302-30. In: Carroll KC, Pfaller MA, Landry ML, McAdam AJ, Patel R, Tichter SS, Warnock DW. (eds). Manual of Clinical Microbiology. 12th ed. Washington, DC.: ASM Press, 2019.
2. Miller JM, Binnicker MJ, Campbell S, Carroll KC, Chapin KC, Gilligan PH, et al. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. Clin Infect Dis. 2018; 67:813-6.
3. Schaeffer AJ, Nicolle LE. Urinary tract infections in older men. N Engl J Med. 2016; 374: 2192.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Identificación de microorganismos a partir de la muestra directa de orina mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF)	PNT-UR-04	
		Edición N° 01	Página 1 de 6

PNT-UR-04

Identificación de microorganismos a partir de la muestra directa de orina mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF)

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2019	Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Identificación de microorganismos a partir de la muestra directa de orina mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF)	PNT-UR-04	
		Edición N° 01	Página 2 de 6

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

En este procedimiento se describe el protocolo de identificación directa de microorganismos a partir de las muestras de orina mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF). Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de Microbiología Clínica que dispongan de un aparato de espectrometría de masas.

2. FUNDAMENTO

La infección del tracto urinario (ITU) es una de las infecciones más comunes tanto en la atención primaria como en el ambiente hospitalario. La pielonefritis y la sepsis urinaria son infecciones graves que requieren un manejo rápido y apropiado de los pacientes. El diagnóstico rápido ayuda no solo a identificar el foco de la infección, sino también a identificar los patógenos causantes y de esta manera dirigir el tratamiento. A diferencia de las bacteriemias, donde la densidad de microorganismos en sangre suele ser muy baja y por lo tanto el diagnóstico rápido aplicado a la muestra directa actualmente se basa en las técnicas de biología molecular, las ITU con frecuencia presentan recuentos altos de microorganismos en las muestras de orina, lo que permite aplicar técnicas rápidas de identificación directamente en la muestra de orina, como la espectrometría de masas (MALDI-TOF). La principal limitación de la identificación a partir de la muestra de orina es la necesidad de una preparación previa de la muestra, cuyo objetivo es separar las células humanas presentes en la misma, así como eliminar otras sustancias que pueden interferir en el análisis. Una ventaja es que se suele tener un volumen suficiente de orina para recuperar la cantidad necesaria de microorganismo. Teniendo en cuenta el elevado número de muestras de orina que se reciben en los laboratorios de Microbiología, es necesario aplicar algún método de cribado para identificar las muestras potencialmente positivas. Una de las técnicas más usadas para el cribado de las muestras es la citometría de flujo, que no solo detecta la presencia de microorganismos, sino que también los cuantifica, facilitando la decisión de si la muestra es adecuada para la aplicación del protocolo de identificación directa.

En este documento se presenta el protocolo de identificación directa a partir de la muestra de orina mediante MALDI-TOF, usando como método de cribado la citometría de flujo, en particular el citómetro UF1000. Cada laboratorio puede establecer sus propios puntos de corte de recuento de bacterias por microlitro a partir del cual se aplicará el procedimiento, teniendo en cuenta que cuanto mayor es el recuento, mayor probabilidad habrá de identificación válida. Aunque los escatergramas del citómetro pueden servir de ayuda para identificar las muestras potencialmente mixtas (morfologías de cocos y bacilos (software anterior del citómetro UF1000), o de Gram-negativos y Gram-positivos (software actual del UF1000), un paso opcional puede ser realizar una tinción de Gram previo al procesamiento de la muestra para detectar las muestras con varias morfologías. De esa manera se podrá evitar procesar las muestras potencialmente contaminadas, identificar el microorganismo predominante de muestras polimicrobianas u obtener identificaciones no fiables por superposición de los espectros. Alternativamente, la tinción de Gram se puede aplicar al pellet recuperado, cuando no se obtiene una identificación válida a pesar de los recuentos bacterianos altos por citometría, para observar si se trata de muestras con varios morfotipos en la tinción. El pellet obtenido para la identificación directa también se puede utilizar para aplicar métodos rápidos de detección de resistencias y estudios de sensibilidad convencionales. Los laboratorios que no disponen del citómetro de flujo pueden usar la tinción de Gram como método de cribado para los casos concretos cuando está justificado realizar las técnicas rápidas (por ejemplo, en sospecha de sepsis de origen urinario). En este caso, la presencia de al menos una bacteria por campo de 1000x de una gota de orina sin centrifugar se correlaciona con los recuentos de 10^5 UFC/mL.

Este procedimiento se centra básicamente en la identificación de bacterias. Las levaduras no se detectan de manera fiable por citometría de flujo, son patógenos mucho menos frecuentes en ITU grave y su recuperación a partir de la muestra es complicado, principalmente en cuanto a la separación de las células humanas, lo que puede requerir una preparación diferente de la muestra que incluye una lisis de las células humanas, previa a la centrifugación.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Identificación de microorganismos a partir de la muestra directa de orina mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF)	PNT-UR-04	
		Edición N° 01	Página 3 de 6

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Manual de uso de MALDI Biotyper (Bruker).
- Manual de uso de los aparatos de citometría de flujo.

4. MUESTRAS

Para la identificación directa son apropiadas las muestras de orina con volumen suficiente (generalmente de ≥ 10 mL, aunque se pueden obtener identificaciones válidas con menores volúmenes de muestra con recuentos bacterianos muy altos), no especialmente espesas y con recuentos bacterianos altos obtenidos previo análisis mediante citometría de flujo (por ejemplo, el punto de corte usado en varios estudios es de ≥ 5.000 bacterias/ μ L).

Se rechazarán las muestras derramadas, las muestras que no han cumplido con las condiciones de transporte o conservación adecuados, recogidas en contenedores no estériles o muestras mal identificadas.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

5.1 REACTIVOS PARA REALIZAR LA CITOMETRÍA DE FLUJO CON UF1000

- UF Cellsheath
- UF Cellpack CR
- UF Cellpack SF
- UF Fluorocell CR
- UF Fluorocell SF
- Agua destilada
- UF control H y UF control L

5.2 REACTIVOS PARA LA IDENTIFICACIÓN CON MALDI-TOF

- Agua calidad HPLC.
- Etanol absoluto grado HPLC.
- Ácido fórmico al 70%.
- Acetonitrilo.
- *Bacterial Test Standard* (BTS)
- Matriz orgánica de HCCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico).

Los reactivos necesarios para la preparación de la matriz, la calibración del aparato y la limpieza de la placa se encuentran detallados en el PNT-MT-01 del Procedimiento SEIMC nº 65. "Aplicaciones de la espectrometría de masas MALDI-TOF en Microbiología Clínica", 2019.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Identificación de microorganismos a partir de la muestra directa de orina mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF)	PNT-UR-04	
		Edición N° 01	Página 4 de 6

6. APARATOS Y MATERIAL

- Citómetro de flujo (UF1000, Sysmex).
- Tubos de recogida de orina estériles de 10 mL compatibles con el citómetro.
- Tubos de plástico estériles de 15 mL (si las muestras llegan al laboratorio en los contenedores de boca ancha y se pasan por el citómetro de manera manual).
- Tubos de microcentrífuga 1,5 mL tipo eppendorf o similares.
- Gradillas.
- Micropipetas.
- Puntas de pipeta estériles con filtro.
- Agitador vórtex.
- Centrífuga y microcentrífuga.
- Contenedores de residuos.
- Cabina de seguridad biológica.

7. PROCEDIMIENTO

7.1 CRIBADO CON EL CITÓMETRO DE FLUJO

- Asegurarse de que el citómetro tiene todos los reactivos necesarios para realización del análisis. Sustituir los reactivos en el caso de necesidad, siguiendo el procedimiento descrito en el manual del equipo UF1000.
- Pasar los controles de calidad interno, UF control H y UF control L. Es necesario hacerlo una vez al día antes de usar el citómetro.
- En el caso de realizar el análisis automático de la muestra, se coloca el tubo de orina en un *rack* e introducir el *rack* en la zona destinada para ello del citómetro. Las muestras que llevan el código de barras se identificarán automáticamente y se les asignará la posición en el *rack* utilizado. Alternativamente, se pueden identificar las muestras de forma manual, indicando el número de la muestra y la posición en el *rack* correspondiente.
- En caso de realizar el análisis manual, transmitir 1 mL de orina a un tubo de 1,5 mL, introducir el número de muestra y realizar el análisis.
- Una vez finalizado el análisis, el citómetro facilitará una serie de parámetros, de los cuales habrá que fijarse sobre todo en el recuento de bacterias/ μL . Las orinas que cumplen con el punto de corte establecido (en el presente procedimiento consideramos ≥ 5.000 bacterias/ μL) se procesarán mediante MALDI-TOF.

7.2 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA LA IDENTIFICACIÓN CON MALDI-TOF

- Transferir 10 mL de orina en un tubo estéril y centrifugar a $850 \times g$ 5 min.
- Repartir el sobrenadante en 4 tubos estériles de 1,5 mL y desechar el sedimento (células humanas).
- Centrifugar los tubos a $15.500 \times g$ durante 2 minutos y rechazar el sobrenadante.
- Resuspender el *pellet* del primer tubo con 1 mL de agua estéril y pasar su contenido en el siguiente, así sucesivamente hasta tener toda la suspensión en un único tubo.
- Volver a centrifugar el tubo a $15.500 \times g$ durante 2 minutos y rechazar el sobrenadante.
- Resuspender el *pellet* con 1 mL de agua estéril y volver a centrifugar. Rechazar el sobrenadante.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Identificación de microorganismos a partir de la muestra directa de orina mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF)	PNT-UR-04	
		Edición N° 01	Página 5 de 6

- Recoger el *pellet* con asa de 1 µL o depositar 1 µL de la suspensión de *pellet* sobre un pocillo de la placa de MALDI-TOF. Procesar cada muestra por duplicado.
- Dejar secar la preparación.
- Cubrir cada preparación con 1 µL de ácido fórmico y dejar secar.
- Añadir 1 µL de matriz HCCA y dejar secar.
- Introducir la placa en el aparato para su análisis.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Los resultados de MALDI-TOF obtenidos de la muestra directa de orina se interpretan según los mismos criterios que se aplican a la identificación a partir de las colonias de microorganismos y que están descritos en el PNT-MT-01 del Procedimiento SEIMC n° 65. Brevemente, si se obtiene el *score* de $\geq 2,3$ la identificación es fiable a nivel de especie, con un *score* entre 2,0 y 2,3 la identificación es fiable a nivel de género y probable a nivel de especie, el *score* entre 1,7 y 2,0 indica una identificación probable a nivel de género, mientras que los *scores* por debajo de 1,7 se consideran como la identificación no fiable.

En muchos estudios se ha intentado bajar el *score* aceptable para la muestra directa debido a que éste casi siempre es algo inferior al obtenido a partir de una colonia. Aun así, es recomendable considerar solo el *score* por encima de 1,7 para comunicar los resultados de identificación preliminar, teniendo en cuenta la repercusión que puede tener una identificación errónea o poco fiable en el manejo de paciente.

9. RESPONSABILIDADES

El procedimiento puede llevarse a cabo por personal técnico o facultativo del laboratorio. Para ello dicho personal debe tener conocimientos sobre la base teórica del ensayo y estar entrenado para realizar el procedimiento. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el facultativo especialista responsable.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Si no se obtiene la identificación válida a partir de la muestra directa, se puede aplicar el protocolo de extracción de proteínas descrito en el PNT-MT-01 del Procedimiento SEIMC n° 65. Hay que tener en cuenta que, si se pretende realizar más estudios a partir del *pellet*, habrá que centrifugar más orina para tener el *pellet* intacto. Alternativamente, si no se obtiene una identificación fiable a partir de la muestra directa, se pueden realizar cultivos de corta incubación (3-5 h) en un medio no selectivo (agar sangre), sembrando un par de gotas de orina (aproximadamente 100-200 µL cada gota) sin extender. En este caso, una vez que se obtiene el crecimiento, se procederá según el protocolo de identificación mediante MALDI-TOF a partir de las colonias. Este procedimiento puede ser especialmente indicado cuando no se dispone de suficiente volumen de la muestra para ser centrifugada o el *pellet* obtenido es muy escaso.

Se recomienda aplicar el protocolo a las muestras de pacientes en los cuales el diagnóstico rápido aporta un valor clínico evidente, como pacientes con clínica grave de pielonefritis y sepsis urinaria. Es recomendable valorar otros parámetros del sedimento urinario, tales como la presencia de abundantes células de descamación, que pueden indicar una probable contaminación de la muestra y requieren interpretar los resultados de identificación directa con precaución.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Identificación de microorganismos a partir de la muestra directa de orina mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF)	PNT-UR-04	
		Edición N° 01	Página 6 de 6

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Son varias las limitaciones del protocolo descrito:

1. Las muestras deben cumplir ciertos criterios: volumen suficiente, no espesas, recuentos altos de microorganismos. Todas las muestras que no cumplen los requisitos deben seguir el procedimiento rutinario de diagnóstico o se pueden cultivar 3-5 h antes de ser procesadas mediante MALDI-TOF.
2. Posibilidad de obtener identificaciones no fiables debido a la presencia de restos celulares u otras sustancias provenientes de la orina.
3. Identificaciones no fiables en el caso de infecciones polimicrobianas.
4. Posibilidad de identificar los microorganismos en las muestras contaminadas, si alguno de ellos se encuentra en recuento mayor en comparación con los demás.
5. Protocolo probablemente no válido para las muestras con levaduras por dos razones: a) las levaduras pocas veces alcanzan recuentos tan altos como las bacterias (≥ 5.000 por μL) y, por tanto, usando el punto de corte propuesto, no se procesarían; b) el protocolo de centrifugación diferencial descrito no es apropiado para levaduras, ya que tienden a sedimentar junto con las células humanas durante la primera centrifugación.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Zboromyrska Y, Bosch J, Aramburu J, Cuadros J, Garcia-Riestra C, Guzman-Puche J, et al. A multicentre study investigating parameters which influence direct bacterial identification from urine. PLoS One. 2018;13:e0207822.
2. Zboromyrska Y, Rubio E, Alejo I, Vergara A, Mons A, Campo I, et al. Development of a new protocol for rapid bacterial identification and susceptibility testing directly from urine samples. Clin Microbiol Infect. 2016; 22:561.e1-6.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de carbapenemasas y BLEE mediante pruebas colorimétricas a partir de colonia y muestra directa de orina	PNT-UR-05	
		Edición N° 01	Página 1 de 7

PNT-UR-05

Detección de carbapenemasas y BLEE mediante pruebas colorimétricas a partir de colonia y muestra directa de orina

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2019	Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de carbapenemasas y BLEE mediante pruebas colorimétricas a partir de colonia y muestra directa de orina	PNT-UR-05	
		Edición N° 01	Página 2 de 7

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

En este procedimiento se describen las técnicas caseras colorimétricas para la detección de la actividad hidrolítica de carbapenemasas y BLEE (β -lactamasas de espectro extendido) en aislados de Enterobacteriales (carbapenemasas y BLEE) y *Pseudomonas aeruginosa* (carbapenemasas).

2. FUNDAMENTO

El aumento progresivo de bacterias productoras de BLEE y carbapenemasas que se ha observado durante los últimos años, hace necesario disponer de herramientas rápidas de detección de resistencias. Los antibióticos betalactámicos siguen siendo un pilar importante en el tratamiento tanto empírico como dirigido de las infecciones causadas por bacilos Gram-negativos. Las técnicas de diagnóstico rápido permiten no solo ajustar cuanto antes el tratamiento y de este modo mejorar el pronóstico de los pacientes, sino también aplicar las medidas de control de infección nosocomial y prevenir la diseminación de bacterias multirresistentes.

Las técnicas colorimétricas de detección de β -lactamasas están basadas en la detección de hidrólisis de un antibiótico diana en presencia de una cepa productora de β -lactamasa, lo que provoca una disminución del pH y un cambio del color del medio de reacción gracias a la presencia de un indicador de pH. La elección del antibiótico diana depende de tipo de enzima que se pretende detectar. Por ejemplo, imipenem se utiliza para la detección de carbapenemasas, y cefotaxima para la detección de BLEE. El tiempo de incubación necesario para detectar la actividad de la enzima en cuestión varía entre 5 min y 2 h, dependiendo de tipo de β -lactamasa y su nivel de expresión.

Tanto los métodos caseros como las técnicas comerciales suelen presentar buena sensibilidad y especificidad global, y por lo tanto la elección de una u otra va a depender de las condiciones de cada laboratorio. En este protocolo se describen los métodos caseros de detección de BLEE y carbapenemasas mediante las técnicas Carba NP y ESBL NDP.

La principal limitación de estas técnicas es que el resultado depende del nivel de expresión del enzima y la sensibilidad puede ser algo más baja para algunas β -lactamasas como, por ejemplo, las enzimas de tipo OXA-48 *like*. En el caso de usar el protocolo casero es importante asegurar que todos los reactivos se preparan y se almacenan de manera apropiada y no se utilizan más allá de su tiempo útil, que se debe especificar en el protocolo.

Las técnicas colorimétricas para la detección de β -lactamasas han sido ampliamente evaluadas a partir de colonias de bacterias crecidas en los medios de cultivo no selectivos, pero algunas de ellas, como ESBL NDP o β -Lacta test para la detección de BLEE, también se han evaluado a partir de las muestras directas de orina con resultados excelentes.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI standard M100; 29th edition, Wayne, PA. CLSI 2019 (o la versión vigente)

4. MUESTRAS

Cepas de *Enterobacterales* y *P. aeruginosa* aisladas en medios de cultivo o el *pellet* bacteriano recuperado de la muestra directa de orina tras la identificación directa mediante MALDI-TOF (PNT-UR-04 de este procedimiento SEIMC).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de carbapenemasas y BLEE mediante pruebas colorimétricas a partir de colonia y muestra directa de orina	PNT-UR-05	
		Edición N° 01	Página 3 de 7

Los medios de cultivo recomendados son medios no selectivos como AS (agar sangre), TSA (agar Trypcasa Soja), MH (agar Mueller-Hinton) y MHE (agar Mueller-Hinton E). No se recomienda usar medios que detectan el cambio de pH debido a la fermentación de sustratos (CLED, MacConkey, medios cromogénicos, etc.).

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

5.1. REACTIVOS

- Agua estéril (calidad HPLC)
- Sustancia valorada de imipenem monohidrato o imipenem/cilastatina (frasco ampolla Tienam-MSD), ceftaxima y tazobactam.
- 20 mM Tris-HCl lysis buffer (B-PERII, *Bacterial Protein Extraction Reagent*)
- Zinc sulfate heptahydrate ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) en polvo
- Rojo fenol en polvo
- Solución de 1 N NaOH o hidróxido de sodio en escamas/polvo
- Solución de 10% HCl

5.2. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

1) Preparación de la solución 10 mM de heptahidrato de sulfato de zinc (*Zinc sulfate heptahydrate*) (para Carba NP test)

- Pesar 1,4 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- Disolver el polvo en 500 mL de agua. Agitar
- Alternativamente se puede preparar 10 mL solución stock de 100 mM. Para ello pesar 0,28 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y disolver en 10 mL de agua estéril. Para trabajar se realiza una dilución 1:10 de la solución *stock* para obtener el volumen necesario de la solución de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a concentración 10 mM.
- Almacenar a temperatura ambiente. La fecha de caducidad de la solución dependerá de la fecha de caducidad del reactivo usado, pero nunca debe exceder 1 año desde el momento de su preparación.

2) Preparación de la solución 0,5% de rojo fenol (para Carba NP y ESBL NDP)

- Pesar 0,5 g de polvo de rojo fenol
- Disolver en 100 mL de agua estéril. Agitar.
- Imacernar a temperatura ambiente. Agitar antes de usar. La fecha de caducidad de la solución dependerá de la fecha de caducidad del reactivo usado, pero nunca debe exceder 1 año desde el momento de su preparación.

3) Preparación de la solución de 0,1 N de hidróxido sódico (para Carba NP y ESBL NDP)

- Preparar una solución 1 N NaOH, si se dispone del reactivo en escamas, siguiendo las instrucciones indicadas en el recipiente. A continuación, añadir 20 mL de la solución 1 N NaOH a 180 mL de agua estéril para obtener una solución 0,1 N NaOH.
- Alternativamente se pueden pesar 0,8 g de hidróxido de sodio y disolver en 200 mL de agua estéril para obtener una solución 0,1 N.
- Almacenar a temperatura ambiente. La fecha de caducidad de la solución dependerá de la fecha de caducidad del reactivo usado, pero nunca debe exceder 1 año desde el momento de su preparación.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de carbapenemasas y BLEE mediante pruebas colorimétricas a partir de colonia y muestra directa de orina	PNT-UR-05	
		Edición N° 01	Página 4 de 7

4) Preparación de la solución A (para Carba NP y ESBL NDP)

- En un recipiente estéril (por ejemplo, un recipiente de orina de boca ancha) mezclar 16,6 mL de agua estéril con 2 mL de la solución 0,5% de rojo fenol. Agitar.
- Añadir a la solución 180 µL de la solución 10 mM de sulfato de zinc (solo es necesario para carba NP test). Agitar.
- Ajustar a pH $7,8 \pm 0,1$ con NaOH 0,1 N (si el pH es muy elevado ajustar usando HCl 10%).
- La solución A se guarda a 4-8°C protegida de la luz un máximo de 2 semanas. El color de la solución debe permanecer rojo o rojo-anaranjado. Si el color cambia, volver a medir y ajustar el pH.

5) Preparación de la solución B (para Carba NP y ESBL NDP)

- Determinar qué cantidad de la solución B se necesita, teniendo en cuenta que la concentración final de imipenem o cefotaxima debe ser de 6 mg/mL. Por ejemplo, para el ensayo Carba NP hay que disolver 6 mg de imipenem (potencia 100%, o recalcular la cantidad de polvo a añadir según la potencia indicada en el frasco) o 12 mg de imipenem/cilastatina en 1 mL de la solución A. 1 mL de la solución B sirve para preparar 10 tubos de reacción (100 µL por tubo), es decir, para testar 7 cepas a la vez, teniendo en cuenta 1 tubo para el control positivo, uno para el control negativo y un tubo de control sólo con reactivo sin inocular el microorganismo. En el caso de ESBL NDP hay que preparar 2 tubos con la solución B para cada cepa, para controles positivo y negativo y control de reactivo.
- La solución B se almacena a 4-8°C un máximo de tres días.
- Alternativamente se pueden preparar tubos de 0,5 mL de microcentrifuga con 0,6 mg de imipenem o 1,2 mg de imipenem/cilastatina en el caso de Carba NP, o con 0,6 mg de cefotaxima en el caso de ESBL NDP y guardar a -20°C. En el momento del ensayo se saca el número de tubos necesario y se añade a cada uno 100 µL de la solución A. En el caso de utilizar este protocolo hay que asegurarse de que la balanza utilizada para pesar el antibiótico debe ser de precisión. Si no se dispone de una balanza de precisión que permita pesar bajas cantidades de reactivo, se recomienda usar el protocolo anterior y pesar al menos 10 mg de polvo de antibiótico para preparar la solución B.
- En el caso del ESBL NDP test hay que preparar la solución concentrada de tazobactam (40 mg/mL) y guardar en la nevera un máximo de tres días.

6. APARATOS Y MATERIAL

- Tubos de microcentrifuga 1,5 mL tipo *ependorf* o similares
- Asas de 1 µL
- Micropipetas
- Puntas de micropipetas
- Vórtex
- Microcentrifuga
- Báscula de precisión
- Espátula
- Contenedores para preparar/almacenar los reactivos preparados (recipientes de orina estériles de boca ancha o tubos Falcon de 50 mL)
- pH-metro
- Contenedores de residuos
- Cabina de seguridad biológica
- Nevera

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de carbapenemasas y BLEE mediante pruebas colorimétricas a partir de colonia y muestra directa de orina	PNT-UR-05	
		Edición N° 01	Página 5 de 7

7. PROCEDIMIENTO









Para realizar el ensayo es necesario tener disponible un control positivo (cepa productora de carbapenemasa y BLEE bien caracterizada a nivel molecular) y un control negativo (cepa no productora de β -lactamasas, por ejemplo, *Escherichia coli* de la colección ATCC 25922). Los controles se procesan con cada tanda de cepas a estudiar. Si se trabaja con colonias es recomendable usar los cultivos de 18-24 h en medios no selectivos. En el caso de trabajar con el *pellet* recuperado de la muestra directa, ver la parte de preparación de muestra para la identificación directa mediante MALDI-TOF en el PNT-UR-04 de este procedimiento SEIMC.

- Para el ensayo Carba NP hay que rotular tubos de microcentrifuga: dos tubos (tubo A y tubo B) para cada cepa estudiada, para el control positivo, para el control negativo y para el control de reactivo sin microorganismo. En el caso del ESBL NDP test hay que rotular tres tubos (A, B y C) para cada cepa y control.
- Añadir 100 μ L del tampón de extracción B-PERII a cada tubo.
- En el caso de Carba NP:
 - Inocular los tubos A y B con un asa completa de 1 μ L de cepa a estudiar. Hacer lo mismo para las cepas usadas como control positivo y negativo. Dejar dos tubos de control de reactivos sin inocular. Mezclar bien.
 - Añadir 100 μ L la solución A al tubo A.
 - Añadir 100 μ L la solución B al tubo B.
- En el caso de ESBL NDP:
 - Inocular los tubos A, B y C con un asa completa de 1 μ L de cepa a estudiar. Hacer lo mismo para las cepas usadas como control positivo y negativo. Dejar dos tubos de control de reactivos sin inocular. Mezclar bien.
 - Añadir 10 μ L de la solución concentrada de tazobactam al tubo C.
 - Añadir 100 μ L la solución A al tubo A.
 - Añadir 100 μ L la solución B a los tubos B y C.
- Tapar los tubos y vortear 5-10 segundos.
- Incubar los tubos a 35-37°C un máximo de 2 horas para Carba NP y 15 minutos para el ESBL NDP. Se recomienda inspeccionar los tubos cada 15 minutos en el caso de Carba NP test. El resultado se puede interpretar e informar en cuanto se detecta la hidrólisis.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

En primer lugar, se leerán los tubos de control positivo, negativo y de control de reactivos. Si se obtienen resultados inválidos en los tubos control, los resultados del resto de las cepas testadas no pueden ser interpretados y habrá que repetir el ensayo. Los tubos de reactivo sin microorganismo deben permanecer con su color original (rojo o rojo anaranjado), tanto el tubo A como el B. Los controles positivo y negativo, así como los resultados de los tubos con cepas a estudiar se interpretan tal y como se indica en la tabla para los tubos A y B de ambos ensayos. En el caso del ESBL NDP test, el tubo C permite la detección de BLEE de la clase A: **1.** Si el tubo B cambia de color (resultado positivo) y el color del tubo C es igual al del tubo A (no hay cambio de color), la cepa es productora de BLEE de la clase A; **2.** Si el tubo B cambia de color (resultado positivo) y el color del tubo C es igual al del tubo B (cambia de color), la cepa es productora de β -lactamasa tipo AmpC o de BLEE y AmpC (no hay inhibición por tazobactam).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de carbapenemasas y BLEE mediante pruebas colorimétricas a partir de colonia y muestra directa de orina	PNT-UR-05	
		Edición N° 02	Página 6 de 7

Tubo A (con la solución A)	Tubo B (con la solución B)	Interpretación
Rojo 	Naranja 	Positivo
Rojo 	Amarillo 	Positivo
Rojo anaranjado 	Amarillo 	Positivo
Rojo 	Rojo 	Negativo
Rojo anaranjado 	Rojo anaranjado 	Negativo
Amarillo o naranja	Indiferente	Inválido

El resultado positivo de la prueba se informa como “Negativo”. El resultado positivo se informa como “Positivo” o “Cepa productora de carbapenemasa”, o “Cepa productora de BLEE”.

9. RESPONSABILIDADES

El procedimiento puede llevarse a cabo por personal técnico o facultativo del laboratorio. Para ello dicho personal debe tener conocimientos sobre la base teórica del ensayo y estar entrenado para realizar el procedimiento. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el facultativo especialista responsable. El método casero debe ser validado en cada laboratorio previo su uso en la rutina y es la responsabilidad del personal técnico y facultativo del área asegurar la correcta preparación, almacenamiento y uso de reactivos.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Es importante asegurar que todos los reactivos se preparan y se almacenan de manera apropiada y no son usados más allá de su tiempo útil especificado en el protocolo.

Todo el personal del laboratorio de Microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento elaborado por el laboratorio de Microbiología.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- El método descrito solo detecta el mecanismo enzimático de resistencia a los antibióticos betalactámicos. Otros mecanismos de resistencia, tales como bombas de expulsión, pérdida de permeabilidad, etc., no se pueden detectar mediante este método.
- El método Carba NP tiene una sensibilidad de >90% para detectar carbapenemasas tipo KPC, NDM, VIM, IMP y SME, según los estudios publicados. La sensibilidad para detectar las carbapenemasas tipo OXA-48 *like* varía, según estudios, de 20% a >90%. La especificidad de la técnica es de >90%. Para otro tipo de carbapenemasas la sensibilidad y especificidad pueden variar. El ensayo de ESBL NDP tiene una sensibilidad y especificidad de >90% para la detección de BLEE de tipo CTX-M, actualmente la más prevalente.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de carbapenemasas y BLEE mediante pruebas colorimétricas a partir de colonia y muestra directa de orina	PNT-UR-05	
		Edición N° 01	Página 7 de 7

Para otro tipo de BLEE la sensibilidad y especificidad pueden variar.

- Las pruebas Carba NP y ESBL NDP en ningún caso sustituyen a los procedimientos convencionales de detección de resistencias y estudio de sensibilidad. El resultado positivo confirma la presencia de carbapenemasa o BLEE, mientras que el resultado negativo puede requerir más estudios para descartar la resistencia.
- La actividad hidrolítica de cada tipo de carbapenemasa puede ser distinta y por lo tanto se necesitará un tiempo de incubación diferente hasta el resultado positivo. Así, las carbapenemasas tipo KPC puede producir un resultado positivo en 5-30 minutos, las metalo- β -lactamasas entre 30 minutos y 1 hora, y las de tipo OXA-48 like pueden requerir la incubación máxima de 2 h.
- A veces se obtienen resultados inválidos que no permiten interpretar el ensayo.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Dortet L, Brechard L, Poirel L, Nordmann P. Impact of the isolation medium for detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae using an updated version of the Carba NP test. *J Med Microbiol.* 2014; 63:772-6.
2. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing enterobacteriaceae from urine samples by use of the ESBL NDP test. *J Clin Microbiol.* 2014; 52:3701-6.
3. Gallah S, Decre D, Genel N, Arlet G. The beta-Lacta test for direct detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in urine. *J Clin Microbiol.* 2014; 52:3792-4.