



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
ESPECIALIZACIÓN EN BIOQUÍMICA CLÍNICA
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS DE MUESTRA DE
ORINA POR MÉTODO DE EXTRACCIÓN MALDI-TOF

T E S I S A
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
ESPECIALISTA EN BIOQUÍMICA CLÍNICA

PRESENTA:
LIC. SILVANA ESTEFANÍA TORRES VEINTIMILLA

ASESORA:
M. EN F. MARÍA DEL CONSUELO VELÁZQUEZ ACOSTA

CIUDAD DE MÉXICO, MARZO 2018





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado Asignado:

Presidente: Dr. Rodolfo Pastelín Palacios

Vocal: Dr. Luis Manuel Perea Mejía

Secretaria: M. en F. María del Consuelo Velázquez Acosta

1er Suplente: Dr. Gonzalo Castillo Rojas

2° Suplente: EBC. Ana Margarita Zavala Ortiz

Trabajo realizado en el Instituto Nacional de Cancerología, Laboratorio de Microbiología.

Asesor del Tema:

M. en F. María del Consuelo Velázquez Acosta

Sustentante:

Lic. Silvana Estefanía Torres Veintimilla

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al todo el equipo de profesionales del Laboratorio de Microbiología del Instituto Nacional de Cancerología por abirme las puertas de su lugar de trabajo, compartir sus conocimientos y brindarme su ayuda incondicional.

A mi maestra y asesora María del Consuelo por su calidez, paciencia y profesionalismo que hizo que todo fuera más fácil.

A mis padres y esposo, quienes me apoyaron en todo lo indispensable.

A todos, gracias.

2.13.	Urocultivo	28
2.13.1	Medios de cultivo	28
2.14.	Tratamiento antimicrobiano y resistencia	29
CAPÍTULO III		30
3.	OBJETIVOS	30
3.1.	Objetivo General.....	30
3.2.	Objetivos Específicos:.....	30
CAPÍTULO IV		30
4.	DISEÑO METODOLÓGICO.....	30
4.1.	TIPO DE ESTUDIO	30
4.2.	ÁREA DE ESTUDIO	30
4.3.	POBLACIÓN.....	31
4.4.	MUESTRA.....	31
4.5.	CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN	31
4.5.1.	Criterios de Inclusión:	31
4.5.2.	Criterios de Exclusión:	31
4.6.	MATERIAL Y MÉTODOS	31
4.6.1.	Equipos:	31
4.6.2.	Material:.....	32
4.6.3.	Reactivos:.....	32
4.7.	PROCESO.....	32
4.8.	PLAN DE TABULACION Y ANALISIS	33
4.9.	ASPECTOS ÉTICOS	33
CAPÍTULO V		34
5.	RESULTADOS	34
Gráfico 1. Pacientes del Instituto Nacional de Cancerología		34
Gráfico 2. Parámetros utilizados en el Examen General de Orina como Criterios de Inclusión		34
Gráfico3. Relación entre las 248 muestras seleccionas en el Examen General de Orina y los resultados del Urocultivo		35
Tabla 1. Resultados de las muestras analizadas por MALDI-TOF y Urocultivo.....		35
Tabla 2. MALDI-TOF y Urocultivo, microorganismos identificados.....		36
Tabla 3. Aplicación de medida de concordancia Kappa de Cohen entre Método MALDI- TOF y Urocultivo		37

Tabla 4. Principales parámetros en la descripción de la prueba diagnóstica por método MALDI TOF.....	37
CAPÍTULO VI	38
6. DISCUSIÓN.....	38
CAPÍTULO VII	41
7. CONCLUSIONES.....	41
CAPÍTULO VIII	42
8. BIBLIOGRAFÍA.....	42
CAPÍTULO IX	46
9. ANEXOS.....	46
ANEXO 9.1 Protocolo de elaboración de BTS (Bruker Bacterial Test Estándar)	47
ANEXO 9.2 Protocolo de elaboración de Matriz HCCA.....	48
ANEXO 9.3 Protocolo de Extracción de orina por método MALDI-TOF	49

RESUMEN

Las infecciones urinarias se encuentran entre las infecciones bacterianas más comunes, su etiología varía pero en el 90% de los casos aproximadamente están involucradas bacterias entéricas, especialmente *Escherichia coli*. El diagnóstico precoz es fundamental sobre todo en pacientes oncológicos donde podría ponerse en riesgo la vida del paciente y se evitaría una terapia antibiótica inadecuada o innecesaria. En el presente estudio se evaluó la utilidad del MALDI-TOF para identificar microorganismos a partir de extracción de muestras de orina como una alternativa rápida y confiable.

Se analizaron un total de 248 muestras de orina de pacientes del Instituto Nacional de Cancerología previamente seleccionadas a través de los resultados del Examen General de Orina. Las muestras fueron trabajadas de acuerdo al protocolo de extracción de MALDI-TOF y se tomaron en cuenta los resultados de identificación con un score mayor a 2, para después ser comparadas con el método convencional del urocultivo considerado como “gold estándar” y establecer una concordancia. La información obtenida fue procesada en Excel y SPSS V22.

Del análisis de 248 muestras de orina se obtuvo 146 muestras con resultado negativo en la identificación de microorganismos tanto por MALDI-TOF, como por urocultivo, 102 muestras fueron positivas, 21 muestras fueron identificadas solamente en el urocultivo de las cuales 10 se encontraban con más de 1 microorganismo y 11 muestras obtuvieron una identificación no confiable (INC). A través de la aplicación de Kappa se obtuvo un valor de 0,820 el cual indica un valor de concordancia muy buena entre las dos metodologías. Se utilizó parámetros para la descripción de MALDI-TOF como método diagnóstico rápido en el cual se obtuvo una sensibilidad del 79%, especificidad 100%, VPN 87,4% y VPP: 100%. El resultado de MALDI-TOF nos habla de un método fiable, casi inmediato con una ganancia de 18-48 horas en la identificación en la mayoría de casos.

PALABRAS CLAVE: MICROORGANISMOS, ORINA, MALDI-TOF.

ABREVIACIONES

BLEE Betalactamasas de Espectro Extendido

CDC Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades

EGO Examen General de Orina

EM Espectrometría de masas

INC Identificación no confiable

ITU Infección del tracto urinario

MALDI Matrix-Assisted Laser Desorption/*Ionization* (desorción/ionización láser asistida por matriz)

SUIVE Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica

TOF Time of flight-(tiempo de vuelo)

UFC Unidades formadoras de colonias

URO Urocultivo

VPP Valor predictivo positivo

VPN Valor predictivo negativo

CAPÍTULO I

1.1. INTRODUCCIÓN

Según el informe del 2011 de la Organización Mundial de la Salud, 4 de las 10 principales causas de muerte a nivel mundial están causadas por agentes infecciosos. ⁽²³⁾⁽¹⁵⁾

Las infecciones urinarias se encuentran entre las infecciones bacterianas más comunes. Aproximadamente entre el 30 y 40% de todas las infecciones nosocomiales tienen su origen en un foco urinario, generalmente debidas a un cateterismo vesical, ⁽⁶⁾ su etiología varía pero en la mayoría están involucradas bacterias entéricas, especialmente *Escherichia coli*.⁽²⁷⁾ Otros patógenos que se han encontrado son *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Enterococcus spp.*, y *Staphylococcus saprophyticus*.⁽⁹⁾

Los métodos convencionales como el urocultivo y las pruebas bioquímicas, utilizados para la confirmación de infecciones urinarias tardan varios días en proporcionar resultados, por lo que obtener un diagnóstico rápido resulta complejo. ⁽¹⁵⁾⁽¹⁰⁾

Para un óptimo manejo de los pacientes es indispensable obtener la identificación microbiológica del agente patógeno en el menor espacio de tiempo posible, y así será posible aplicar un tratamiento antibiótico efectivo o reducir el espectro del tratamiento administrado empíricamente, disminuyendo la aparición de resistencias y posibles complicaciones.

A través de este trabajo, se propone el análisis de orina por extracción con el método de ionización- desorción por láser asistida por matriz en tiempo de vuelo (MALDI-TOF) para evaluarlo como un método rápido para la identificación bacteriana.

1.2. ANTECEDENTES

Según el Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica (SUIVE) las infecciones urinarias se encuentran en el tercer lugar de las 20 causas de enfermedad a nivel nacional. ⁽⁴⁾

La identificación bacteriana en el laboratorio de Microbiología Clínica se realiza usualmente a partir de características tintoriales y morfológicas de los microorganismos, de su crecimiento en distintos medios de cultivo y atmósferas, de diversas pruebas que determinan características bioquímicas de las bacterias y en algunos casos, a partir de la sensibilidad a los antimicrobianos. ⁽¹⁰⁾⁽¹⁵⁾

Aunque la identificación ha evolucionado en cuanto a la reducción de las series de pruebas y a la automatización de su realización y lectura, la mayoría de las técnicas se siguen basando en buena parte en los mismos principios y recursos que las pruebas en uso hace 25–30 años, lo que conlleva a que la identificación del microorganismo se retrase horas o incluso días desde su crecimiento en los medios de cultivo. ⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾⁽¹⁵⁾

1.3. JUSTIFICACIÓN

La identificación bacteriana basada en el perfil de proteínas obtenido mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) fué ya propuesta hace varias décadas, sin embargo, recientemente ha empezado a usarse a nivel clínico.

Hasta el momento se han efectuado estudios sobre su efectividad para la identificación de determinados microorganismos en condiciones controladas, a través de extracción de muestras de hemocultivos, pero son muy escasos los trabajos que han estudiado su efectividad en la identificación de aislamientos clínicos sometidos a ésta prueba directamente desde muestra de orina.

El Instituto Nacional de Cancerología es un hospital de tercer nivel, centro de referencia de toda la República Mexicana de pacientes adultos con cáncer, la metodología MALDI-TOF se aplica solamente a hemocultivos y colonias de una muestra previamente sembrada.

En el presente estudio se analizará la eficacia de MALDI-TOF para la identificación de microorganismos por extracción de una muestra de orina como un método rápido, el cual tendrá un gran impacto y beneficio para el manejo antimicrobiano en los pacientes ya que el INCAN cuenta con un estudio de los patrones de susceptibilidad antimicrobiana de bacterias aisladas en urocultivos para la aplicación de tratamiento empírico.

1.4. HIPÓTESIS

El uso del método MALDI-TOF por extracción en muestra de orina, promete una alternativa rápida y confiable para identificación de agentes causantes de Infecciones del Tracto Urinario, reduciendo tiempos de estudio que van de 18-24 horas en métodos convencionales, lo cual beneficia directamente al estado de salud del paciente y su manejo antimicrobiano.

CAPÍTULO II

2. FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1. Infección del tracto urinario (ITU)

Son definidas por los Centros para el Control y Prevención de las Enfermedades (CDC) como un proceso inflamatorio que involucra la invasión y multiplicación de microorganismos en el tracto urinario. La definición exacta exige la presencia de gérmenes en las vías urinarias y su cuantificación en al menos 10^5 unidades formadoras de colonias (UFC)/ mL de orina. ⁽⁷⁾⁽²⁴⁾

2.1.1. Clasificación de las infecciones urinarias:

Según su localización pueden ser de vías urinarias altas o bajas

- **ITU baja:** Colonización bacteriana a nivel de uretra y vejiga, presencia de síntomas y signos urinarios, como urgencia, disuria, polaquiuria, turbidez y olor fétido de la orina. Incluye a la cistitis y uretritis.
- **ITU alta:** Presencia de signos y síntomas de ITU baja, asociada a colonización bacteriana a nivel ureteral y del parénquima renal, con signos y síntomas sistémicos como, escalofríos, fiebre, dolor lumbar, náuseas y vómitos. En este grupo se encuentran las pielonefritis.

Por epidemiología se dividen en adquiridas en la comunidad o adquiridas a nivel hospitalario.

- **ITU adquirida a nivel hospitalario:** Aparición de infección urinaria a partir de las 48 horas de la hospitalización de un paciente sin evidencia de infección previa, asociada a algún procedimiento invasivo, en especial, colocación de un catéter urinario.

Por los factores asociados y gravedad, en complicadas o no complicadas

- **ITU no complicada:** ocurre en pacientes que tienen un tracto urinario sin alteraciones funcionales o anatómicas, sin una historia reciente de instrumentación (sondaje, uretroscopia) y cuyos síntomas están limitados a la uretra y vejiga. Estas infecciones son muy frecuentes en mujeres jóvenes con una vida sexual activa.
- **ITU complicada:** Ocurre debido a factores anatómicos, funcionales o farmacológicos que predisponen al paciente a una infección recurrente o a fracaso del tratamiento. Estos factores pueden ser ampliación de la próstata, obstrucciones y otros problemas que requieren la colocación de dispositivos urinarios y a la presencia de bacterias multirresistentes. Su espectro comprende desde una cistitis complicada hasta una urosepsis con choque séptico.

Por la presentación clínica, en asintomática o sintomática

- **ITU asintomática:** Muchos pacientes pueden tener una bacteriuria significativa ($\geq 10^5$ UFC/mL de orina) sin presentar síntomas.
- **ITU sintomática:** pacientes con síntomas como fiebre, disuria, tenesmo y además presentan bacteriuria significativa ($\geq 10^5$ UFC/mL de orina)⁽⁸⁾⁽²⁶⁾

2.2. Epidemiología de las Infecciones del Tracto Urinario

Las infecciones del tracto urinario (ITU) se encuentran entre las infecciones bacterianas humanas más comunes, luego de las respiratorias, son las más frecuentes en el ámbito hospitalario y comunidad general.⁽²⁰⁾ Según el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SUIVE) las ITU son la tercera causa de

enfermedad a nivel nacional. ⁽⁴⁾ Más del 80% de las ITU no complicadas son causadas por *Escherichia coli*. ⁽⁹⁾

Se presentan en todos los grupos de edad; en la infancia predominan en los hombres ya que pueden presentar fimosis lo cual favorece la colonización del meato urinario y la uretra; mientras que en adultos es más frecuente en las mujeres con edad entre 20 y 56 años. ⁽²⁶⁾ ⁽²⁴⁾

Se estima que entre 40 y 50% de las mujeres presenta ITU en algún momento de su vida y de éstas, 11% tendrá al menos una infección por año; contrario a la situación de los hombres menores de 50 años, en quienes las ITU presentan una baja prevalencia. La elevada prevalencia de ITU en mujeres se ha explicado por condiciones anatómicas. ⁽²⁴⁾

Estudios previos en Estados Unidos han reportado frecuencia de ITU de 53,067 casos/100,000 mujeres y de 13,689/100,000 hombres; las diferencias por sexo sólo disminuyen después de los 65 años cuando la relación se invierte debido a la retención e incontinencia urinaria y al aumento de hiperplasia benigna de próstata. ⁽²⁴⁾

En 2010 en México, se reportaron 1, 204,032 casos en adultos de 25 a 44 años de edad, con una tasa de incidencia de 3,000 por cada 100,000 habitantes. En mayores de 60 años, la tasa de incidencia fue de 6,000 por cada 100,000 habitantes, con predominio en el sexo masculino. ⁽⁴⁾

2.3. Factores de Riesgo asociados a las ITU

- En las mujeres por la menor longitud de la uretra y su proximidad al ano, ya que aumentan el riesgo de infección por enterobacterias.
- Gestación, dado que durante el embarazo se presentan cambios fisiológicos como variación del pH y el influjo de la progesterona, que disminuyen el tono del músculo liso uretral y la estasis del tracto genitourinario, aumentando la probabilidad de ITU.
- Anomalías anatómicas congénitas, cálculos del tracto urinario, trastornos neurológicos, diabetes mellitus, multiparidad, prolapso de órganos pélvicos.

- Actividad sexual; favorece en las mujeres la entrada de microorganismos al tracto genitourinario y su colonización; el uso de espermicidas, diafragmas y estrógenos alteran la microbiota bacteriana normal elevando el riesgo de ITU y en el caso de los hombres sólo se ha documentado la asociación con relaciones homosexuales. ⁽²⁶⁾⁽²⁴⁾
- Diabetes: Las ITU en pacientes con diabetes pueden ocasionar complicaciones graves como la bacteremia, la necrosis papilar, el absceso perinefrítico, la cistitis o las pielonefritis enfisematosas. Como factores predisponentes se han citado disfunción neurógena vesical de los diabéticos, mayor presencia de alteraciones anatómicas de la vía urinaria (cistocele, rectocele), sexo, la glucosuria, la edad avanzada, la disfunción inmune y la mayor adhesividad del epitelio urinario a las fimbrias tipo 1 de *E. coli*. ⁽¹²⁾
- Pacientes Oncológicos: La neutropenia, colocación de sonda vesical o la obstrucción de las vías urinarias por un tumor son factores de riesgo de desarrollo de infección más importantes en el paciente oncológico. ⁽¹⁷⁾

2.4. Signos y Síntomas

- Disuria
- Polaquiuria
- Hematuria en algunos casos
- Dolor suprapúbico
- Fiebre
- Urgencia miccional. ⁽²⁴⁾

Las ITU siguen la ruta ascendente y son causadas por bacterias presentes en la microbiota intestinal normal. El colon, el introito vaginal y el área periuretral sirven como reservorios para uropatógenos, la bacteria entra por la uretra y asciende hacia la vejiga y asciende a través de los uréteres hasta los riñones. ⁽²⁰⁾

La presencia de bacterias no siempre se refiere a enfermedad. Pueden detectarse bacterias en el tracto urinario de individuos pero no poseer ningún síntoma. Esta condición es llamada bacteriuria asintomática y ocurre en 6% de los individuos sanos y en 20% de los individuos ancianos, generalmente no necesitan tratamiento. Por otro lado, los casos de bacteriuria sintomática son clasificados ya sea como cistitis cuando la infección es limitada a la vejiga o pielonefritis cuando el riñón está infectado.⁽²⁰⁾

2.5. Métodos Diagnósticos para Infecciones del Tracto Urinario

La sospecha de ITU debe confirmarse mediante la realización de un examen general de orina (EGO) y urocultivo.⁽⁴⁾

2.5.1. Obtención de muestra para EGO y Urocultivo

La muestra que se obtiene y se deposita en un frasco estéril es la primera orina de la mañana del chorro medio de la micción, ya que la concentración de bacterias es mayor y evita posibles contaminaciones.⁽⁴⁾⁽²⁶⁾

2.5.2. Instrucciones específicas para obtención de muestras de orina en el INCAN

- Lavado del área genital antes de la obtención de la muestra.
- En hombres, retraer la piel del prepucio.
- Se entrega al paciente un paquete que contiene material con el cual deberá realizar la recolección de su muestra de orina: un recipiente estéril de tapa azul, 1 tubo vacoutainer de tapón gris para urocultivo, 1 tubo vacoutainer de tapón rojo para EGO, ambos con ácido bórico como conservador.
- Abrir la bolsa y sacar el recipiente de tapa azul. En el debe recolectar su muestra de orina con la mitad del volumen del envase.
- Cerrar perfectamente el envase, en la superficie de la tapa azul se encuentra una etiqueta amarilla que contiene un orificio con aguja (es importante que no lo toque).

- Tomar el tubo que tiene tapón gris e introducirlo de forma vertical y con firmeza hasta oír un click; observar que el tubo empieza a llenarse con la orina recolectada hasta llegar a la mitad aproximadamente.
- Retirar el tubo tirando hacia arriba y no destaparlo.
- Realizar el mismo procedimiento para el tubo de tapón rojo.
- Una vez concluido el proceso, destapar el recipiente de tapa azul, tirar la orina sobrante en el sanitario y deseche el recipiente.

2.5.3. Examen General de orina

El examen general de orina (EGO) está compuesto por varias pruebas que identifican las distintas sustancias eliminadas por el riñón; su resultado es de gran importancia en el estudio inicial de enfermedades de origen urinario o sistémico. ⁽¹⁶⁾

El EGO se basa en tres pruebas:

Examen Físico: en él se evalúan las características organolépticas de la orina como:

- **Volumen**
- **Aspecto**
- **Color**
- **Olor**

Examen Químico: El análisis químico se realiza con tiras reactivas, las cuales al tener contacto con las sustancias de la orina, producen reacciones químicas que reflejan cambios de color proporcionales a la concentración de las sustancias. ⁽¹⁶⁾

- **pH**
- **Densidad urinaria**
- **Nitritos**
- **Leucocitos**
- **Proteínas**
- **Glucosa**

- **Cetonas**
- **Urobilinógeno**
- **Bilirrubinas**
- **Eritrocitos**

Examen Microscópico: En él se analizan las diversas estructuras que puedan estar presentes en la orina como:

- **Células epiteliales**
- **Eritrocitos**
- **Leucocitos**
- **Bacterias**
- **Cristales**
- **Cilindros**

Los elementos en el sedimento urinario tienen importancia clínica solos o en conjunto, pero ciertas asociaciones como la de bacteriuria con leucocituria en el diagnóstico de ITU son de relevancia. ⁽³³⁾

Para este trabajo se tomaron en cuenta ciertos parámetros del examen químico como nitritos y del examen microscópico bacterias y leucocitos como criterios de inclusión; es por ello importante mencionar algunas características de éstos.

Nitritos: su resultado en orina debe ser negativo. Es un método indirecto para determinar la presencia de algunas bacterias en la orina. Las enterobacterias como *Escherichia coli* tienen la capacidad de reducir los nitratos a nitritos. ⁽¹⁶⁾ Esta prueba cuenta con una alta especificidad para infección urinaria pero baja sensibilidad; por lo tanto, si su resultado es negativo no descarta la existencia de ITU. ⁽¹⁾

Requiere de al menos 4 horas de retención de la orina en la vejiga para que su resultado sea más confiable, es por ello que la muestra debe ser la primera orina de la mañana. ⁽³⁰⁾

Leucocitos: su valor normal en orina es de 0-10 por campo, principalmente neutrófilos. Se considera que existe leucocituria cuando existen más de 10 leucocitos por campo, ésta se encuentra asociada a procesos inflamatorios infecciosos como pielonefritis y a no infecciosos como las quemaduras o instrumentación de la vía urinaria.⁽¹⁶⁾

La coexistencia de leucocituria con bacteriuria es muy importante cuando hay sospecha de ITU.⁽¹⁶⁾⁽¹⁾

Bacterias: no debe existir bacterias la orina, su presencia tiene importancia clínica ya que está relacionada con procesos infecciosos. Se reportan como:

- Bacteriuria escasa
- Bacteriuria moderada
- Bacteriuria abundante

En la práctica clínica, el reporte de bacterias en cantidad moderada a abundante nos ayuda a predecir un resultado positivo en el urocultivo, con una especificidad y eficacia del 80%. A diferencia del reporte de bacteriuria escasa puede deberse a muestras contaminadas, bacteriuria asintomática, infección urinaria en estadio inicial o a pacientes subtratados con antibióticos.⁽¹⁶⁾⁽¹⁸⁾

Los elementos estudiados en el sedimento urinario tienen significancia clínica solos o en conjunto, es por ello de importancia las asociaciones como la de bacteriuria con leucocituria en el diagnóstico de ITU.⁽³³⁾

2.6. Identificación de microorganismos en microbiología

La importancia de poder identificar el agente patógeno responsable de la infección se debe en poder conocer las implicaciones patogénicas/patológicas, la evolución clínica, y aplicar una terapia antimicrobiana eficaz.

Dentro de la rutina diaria, el laboratorio de microbiología aplica técnicas fenotípicas para lograr este objetivo. Sin embargo, existen algunas limitaciones que se pueden observar de manera más evidente para algunos tipos de microorganismos.⁽¹⁹⁾ Los métodos moleculares pueden obviar algunas de estas

limitaciones, pero su implementación no es universal debido a su costo más elevado y al grado de especialización que se requiere para su aplicación, es por ello que la mayoría de métodos moleculares se encuentran en laboratorios o centros de referencia. ⁽⁹⁾⁽¹¹⁾

2.6.1. Métodos fenotípicos

La identificación bacteriana por medio de métodos convencionales basados en las características fenotípicas, son más asequibles debido a su fácil ejecución y costo.

Los métodos tradicionales de identificación bacteriana se basan en las características «observables» de las bacterias, como su morfología, desarrollo y propiedades bioquímicas y metabólicas. ⁽³⁾⁽¹⁰⁾

En la mayoría de los laboratorios se elaboran procesos de manera estandarizada, los cuales utilizan pruebas cuyo propósito final es la identificación del microorganismo a nivel de género y especie, tales como:

- **Características microscópicas:** generalmente a través de la tinción de Gram y Ziehl Neelsen.
- **Características macroscópicas:** morfología, hemólisis y crecimiento en medios de cultivo.
- **Pruebas bioquímicas:**

1) Pruebas que se utilizan en la identificación preliminar y de lectura inmediata como la catalasa y oxidasa.

2) Otras pruebas rápidas, con lectura en menos de 6 horas como la hidrólisis del hipurato, la β -galactosidasa (ONPG), las aminopeptidasas, la ureasa, indol.

3) Pruebas lentas, con lectura de 18 a 48h que incluirían la óxido-fermentación, reducción de nitratos, rojo de metilo, Voges-Proskauer, Agar hierro de Kligler, fermentación de azúcares, hidrólisis de la esculina, fenilalanina-desaminasa, descarboxilasas, lecitinasa, utilización de citratos, utilización de malonato, y prueba de CAMP.

4) Pruebas basadas en caracteres de resistencia a ciertas sustancias: optoquina, bacitracina, solubilidad en bilis, y crecimiento en caldo hipersalino.

5) Otros sistemas: galerías multipruebas, son celdillas aisladas con sustrato liofilizado que se inoculan individualmente y que permiten realizar simultáneamente entre 10 y 50 pruebas bioquímicas. ⁽³⁾⁽¹⁰⁾

2.6.2. Métodos moleculares

Una amplia variedad de genes han sido utilizados como dianas moleculares en los estudios taxonómicos o de filogenia en los distintos géneros y distintas especies bacterianas, constituyendo el análisis del ARNr 16S el marcador inicial y en numerosas situaciones el marcador suficiente para realizar una identificación más precisa. ⁽³⁾

El gen descrito con mayor frecuencia con utilidad en taxonomía bacteriana y/o filogenia es:

- **El ARNr 16S (rrs)**

Es un polirribonucleótido codificado por el gen rrs o ADN ribosomal ARNr 16S (ADN16S) incluido en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. De distribución universal, componente crítico en la función celular, el ARNr 16S actúa como un cronómetro molecular al presentar un alto grado de conservación. Aunque el ARNr 16S constituye la diana de acción para algunos antimicrobianos, produciéndose mutaciones que conducen a la resistencia fenotípica, no se invalida para la identificación bacteriana o la asignación de género y especie. La secuencia del gen ARNr16S presenta de forma aproximada 1.500 pb. Este tamaño proporciona suficiente polimorfismo interespecífico para diferenciar y establecer medidas estadísticas válidas. ⁽³⁾⁽²⁵⁾

Existe también la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) dirigida a genes específicos de distintos microorganismos, algunos ejemplos a continuación:

- *flaA* para *Vibrio cholerae*
- *cadF*, *ceuE* y *cd* gen para *Campylobacter jejuni*

- stx_1 , stx_2 para *Escherichia coli*⁽²⁵⁾

2.6.3. Métodos basados en proteómica

La proteómica es el estudio y caracterización del conjunto de proteínas expresadas por un genoma (proteoma). Las técnicas de proteómica abordan el estudio de este conjunto de proteínas y las más usadas se basan en la electroforesis y en la espectrometría de masas.⁽³⁾⁽²⁸⁾

2.7. La espectrometría de masas

Es una técnica analítica que permite analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos al permitir la medición de iones derivados de moléculas separándolos en función de su relación masa/carga (m/z).⁽³⁾

El espectro de masas de cada compuesto se denomina «huella química» y es una representación gráfica de los fragmentos obtenidos, por orden creciente de masa frente a su abundancia relativa.⁽³⁾

2.8. Componentes básicos de un espectrómetro de masas

2.8.1.1. Fuente de ionización

Es el elemento del espectrómetro que ioniza el material que va ser analizado. Al aplicar sobre una molécula una fuente de ionización se generan iones por el exceso o pérdida de electrones ya que están cargadas eléctricamente. En el caso del MALDI, la muestra es empapada con una matriz orgánica (HCCA), la cual cristaliza en contacto con el aire. Esta mezcla se deposita en una tarjeta de acero inoxidable y es irradiada por un láser (Fig1). La energía del láser causa una desestructuración de la matriz cristalizada generando una nube de partículas. Los iones de ésta nube son acelerados y dirigidos hacia el analizador de masas y luego, al detector. El papel de la matriz es fundamental para los procesos electroquímicos que se producen. Algunas de las matrices más utilizadas son el ácido-ciano-4-hidroxi-trans cinámico, el ácido 2,5-dihidrobenczoico, o el ácido sinapínico.⁽¹¹⁾⁽²²⁾⁽²⁹⁾



Fig1. Rayo láser del equipo MALDI-TOF que incide sobre la muestra aplicada en la tarjeta previa extracción.

2.8.2. Analizador de masas:

Es el componente principal del espectrómetro, el más utilizado en las aplicaciones de la EM dentro del campo de la microbiología es el analizador de tipo TOF. La estructura delimita una zona de vuelo a través de la cual los iones son acelerados adquiriendo una elevada energía cinética y durante este trayecto se separarán según su ratio masa/carga (m/z). El periodo de tiempo que tarda cada ión en llegar hasta el detector es denominado tiempo de vuelo y depende de dicha ratio. ⁽¹¹⁾⁽²²⁾⁽²⁹⁾

2.8.3. Detector

Al final de la zona de vuelo los iones que llegan al detector producen una señal eléctrica que es procesada, ampliada y enviada a un ordenador. A partir de la información recogida por el detector, se genera el espectro de masas o «huella química», en el cual se muestra la masa de los diferentes iones de la muestra calculada a partir del tiempo de vuelo. ⁽¹¹⁾⁽²²⁾⁽²⁹⁾ Los tres elementos se mantienen en una atmósfera de vacío.

En los últimos 20 años, estas nuevas técnicas de EM se convirtieron en indispensables para el avance de la proteómica, sobre todo al ser combinadas con el analizador de masas tipo TOF. Aunque la separación de partículas cargadas basada en la masa y el tiempo de vuelo se conoce desde el 1897, la utilización del tiempo de vuelo como medio para obtener un espectro de masas

tardó en aplicarse en la EM y fue en 1946 cuando apareció la primera referencia de su empleo. ⁽¹⁵⁾⁽²¹⁾

En un principio se efectuaron estudios parciales para conocer su efectividad en la identificación de ciertos microorganismos en condiciones controladas. Actualmente, existen un mayor número de trabajos sobre su efectividad en la identificación de aislamientos clínicos de bacterias grampositivas y gramnegativas de diversos orígenes, directamente desde los medios de cultivo habituales y sin condiciones especiales, como método de rutina. ⁽¹⁵⁾⁽²¹⁾

2.9. Características más importantes de la desorción/ionización láser asistida por matriz de tiempo de vuelo (MALDI-TOF)

– Para obtener iones de forma adecuada es necesario que la muestra esté embebida en una matriz orgánica.

–Como fuente de ionización emplea un láser. Se generan iones tras bombardear con fotones (láser) la muestra. Se producen rayos UV de 337nm.

–La separación de los iones se produce según el «tiempo de vuelo».

Una aplicación de la espectrometría de masas MALDI-TOF de gran interés en microbiología es la «identificación de microorganismos». ⁽³⁾⁽²⁹⁾

2.10. Primeras aplicaciones de la espectrometría de masas a la microbiología

En 1975 se publicó un trabajo en que se utilizó una combinación de pirólisis con EM para la identificación directa de microorganismos liofilizados. Con los espectros obtenidos se diferenció inequívocamente 7 bacterias diferentes (2 grampositivas y 5 gramnegativas). La desventaja de la pirolisis es que el tamaño y el rango de las masas obtenidas por esta técnica son pequeños, por lo cual ofrece poca información estructural.

Posteriormente se utilizó otra metodología, el bombardeo con átomos rápidos o FAB-MS, la cual, a pesar de ofrecer mayor información estructural, solo permite analizar analitos de extractos celulares, como por ejemplo, lípidos de membrana.⁽¹⁵⁾

Posteriormente, Cain et al., diferenciaron diversas bacterias mediante EM tipo MALDI-TOF con una extracción previa de proteínas hidrosolubles.⁽¹⁵⁾ En 1996 se publicaron los primeros estudios en los que se analizaban células bacterianas intactas sin ninguna extracción previa, sino depositando las células directamente en la tarjeta de un instrumento MALDI-TOF y recubriéndola con una matriz orgánica.⁽¹⁵⁾

Holland et al., generaron los espectros de referencia para 5 bacterias gram negativas para proceder posteriormente a su identificación a ciegas, pudiendo identificarlas correctamente.⁽¹⁴⁾

En el trabajo de Claydon et al., fueron 10 las bacterias (6 bacterias gramnegativas y 4 bacterias grampositivas) caracterizadas y posteriormente identificadas mediante la tecnología MALDI-TOF.⁽⁵⁾ A partir de estos estudios iniciales, muchos otros utilizaron la EM para resolver problemas microbiológicos (identificación, genotipado, estudio de resistencias, etc.)

2.11. La espectrometría de masas (EM) en el Laboratorio de Microbiología en la actualidad

Recientemente, han aparecido diversas plataformas que permiten a los laboratorios de microbiología clínica acceder más fácilmente a esta tecnología. Desde el acceso a estas plataformas, el número de publicaciones en las que se habla sobre la EM para la identificación de microorganismos ha ido en aumento.⁽³⁾⁽¹⁵⁾

El equipo con el que cuenta el Laboratorio de Microbiología del Instituto Nacional de Cancerología es el Bruker Daltonik IVD MALDI Biotyper (Fig 2).



Fig2. Espectrómetro de masas Bruker Daltonik IVD MALDI Biotyper

2.12. Espectrometría de masas dirigida a la detección de proteínas actualmente

Las dos plataformas comerciales más utilizadas para esta finalidad son MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Leipzig, Alemania) y Axima@SARAMIS (AnagnosTec GmbH, Potsdam, Alemania).

Bruker Daltonics contiene el espectrómetro de masas o hardware, software y la base de datos para interpretar los resultados. Cuando se obtiene el espectro de masas, se compara con la base de datos y el software proporciona una identificación con un valor o score, el cual nos indica la fiabilidad de la misma. En el caso de Biotyper 2.0, este valor se encuentra en un rango que va de 0 a 3, y se divide el rango en intervalos: un valor ≥ 2 indica una identificación fiable a nivel de especie, un valor entre 1,7 y 2 indica un parentesco muy cercano y ofrece una identificación fiable a nivel de género, y un valor $< 1,7$ muestra una identificación poco fiable.

La matriz que se utiliza es el ácido -ciano-4-hidroxi-trans cinámico. La tarjeta de acero inoxidable donde se colocan las muestras en el sistema de Bruker Daltonics contiene 96 pocillos donde se depositan las muestras, si se colocan 96 muestras se tarda 1 hora en analizarlas.

La muestra de partida puede ser: análisis de células intactas o transferencia directa, y extracción previa de proteínas. ⁽¹⁵⁾⁽²²⁾

- **Análisis de células intactas:** Se selecciona la colonia de interés y se aplica directamente sobre la tarjeta del equipo mediante un asa de siembra, una punta de pipeta o palillo. A continuación, se cubre la muestra con la solución matriz y se deja secar al aire. ⁽¹⁵⁾⁽²²⁾
- **Extracción de proteínas:**

Se ha descrito que una extracción previa de proteínas mejora la identificación, sobre todo cuando se trata de bacterias grampositivas y levaduras.

- **Extracción mediante etanol-ácido fórmico:** Este protocolo utiliza el etanol para inactivar las bacterias y el ácido fórmico para la disrupción de su pared. ⁽¹⁵⁾⁽²²⁾

2.13. Urocultivo

El diagnóstico para infecciones del tracto urinario (ITU) es a través del cultivo, el cual se considera como prueba “gold estándar” o definitiva y busca demostrar la presencia de bacterias. ⁽⁷⁾

El cultivo de orina se realiza para cuantificar el número de bacterias por ml y se expresa como unidades formadoras de colonias/ml (UFC/ml). ⁽²⁶⁾

La técnica de cultivo cuantitativo más utilizada es la siembra con asa calibrada, que permite depositar un volumen determinado de orina sobre la superficie del medio de cultivo. En general, se emplean asas de 0,001 ó 0,01 ml, de forma que se puede cuantificar bacteriurias entre 100-1,000 UFC/ml y más de 100,000 UFC/ml. ⁽⁴⁾⁽⁷⁾⁽²⁶⁾

2.13.1 Medios de cultivo

Los medios de cultivo para orina deben permitir el crecimiento de la mayoría de los uropatógenos. Se recomienda el uso de 2 medios de cultivo:

1. Agar McConkey o Eosina Azul de Metileno (EMB), son selectivos y diferenciales, permiten el crecimiento de *Enterobacteriaceae* y bacilos gramnegativos no fermentadores.
2. Agar sangre: para grampositivos y levaduras.

Muchos laboratorios prefieren utilizar como único medio de cultivo el agar CLED (cistina-lactosa deficiente en electrolitos), un medio diferencial no selectivo que permite el crecimiento de bacterias gramnegativas, grampositivas y levaduras e inhibe el fenómeno de swarming de *Proteus spp.*
(4)(7)

2.15. Microorganismos frecuentes en Infecciones del Tracto Urinario

- *Escherichia coli*
- *Klebsiella spp*
- *Enterobacter spp*
- *Enterococcus spp*
- *Pseudomonas spp*
- *Proteus spp*
- *Staphylococcus saprophyticus*

Existen diferencias importantes en su magnitud y sus factores asociados, según la población de estudio. (24)

2.14. Tratamiento antimicrobiano y resistencia

Hasta hace algunos años existía un esquema terapéutico basado en la administración de nitrofurantoína, trimetoprim-sulfametoxazol o fluoroquinolonas, los cuales tenían un efecto positivo inhibitorio, pero su uso inapropiado o la falta de colaboración por parte del paciente han generado un aumento de la resistencia a antibióticos por parte de estos microorganismos. (7)(8)(24)

Esto constituye un grave problema de salud pública mundial por: su elevada ocurrencia, además que implica un elevado costo para su manejo con una tasa de recurrencia considerable (27-46% por año en mujeres), el desarrollo de

infecciones complicadas y la afectación de la calidad de vida de los pacientes en cada nuevo episodio. ⁽¹⁹⁾⁽²⁴⁾

Se sugiere evaluar los factores de riesgo de resistencia de manera individualizada para ofrecer el manejo empírico óptimo, cuando este es necesario. ⁽¹³⁾

CAPÍTULO III

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Evaluar la utilidad de MALDI-TOF a partir del análisis por extracción de muestras de orina como método rápido para identificación de microorganismos.

3.2. Objetivos Específicos:

3.2.1 Identificar microorganismos en muestras de orina a través del método MALDI-TOF.

3.2.2 Comparar los resultados obtenidos del método MALDI-TOF con los del urocultivo para establecer una concordancia.

CAPÍTULO IV

4. DISEÑO METODOLÓGICO

4.1. TIPO DE ESTUDIO

Estudio Descriptivo Prospectivo

4.2. ÁREA DE ESTUDIO

El INCAN es un hospital de tercer nivel, centro de referencia de toda la República Mexicana, de pacientes adultos con cáncer; cuenta con 135 camas. En él se reporta anualmente una media de 35,000 aplicaciones de quimioterapia, 3,500

cirugías y 7,500 egresos hospitalarios. Ubicado en Ciudad de México, Colonia Belisario Domínguez Sección XVI, Delegación Tlalpan.

4.3. POBLACIÓN

700 pacientes

4.4. MUESTRA

Aplicación de la fórmula:

$$n = \frac{k^2 \cdot p \cdot q \cdot N}{(e^2 \cdot (N-1)) + k^2 \cdot p \cdot q}$$

N: 700 pacientes

k: 95% (nivel de confianza asignado)

e: error muestral deseado 5%

p: 0,5

q: 0,5

n= 248 pacientes

4.5. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

4.5.1. Criterios de Inclusión:

- Pacientes internos y externos del INCAN.
- Pacientes con resultados de EGO que incluyan cantidad moderada a abundantes de bacterias, nitritos positivo y negativo, leucocitos mayores a 10 por campo.

4.5.2. Criterios de Exclusión:

- Pacientes con resultados de EGO sin los parámetros mencionados.
- Pacientes con tratamiento antibacteriano en curso.

4.6. MATERIAL Y MÉTODOS

4.6.1. Equipos:

- Bruker Daltonik IVD MALDI Biotyper
- Microcentrífuga Minni Spin Eppendorf

4.6.2. Material:

- Pipetas Automáticas: 1-10 µl, 50-100 µl, 100-1000 µl.
- Puntas para pipetas automáticas: 1-10 µl, 50-100 µl, 100-1000 µl
- Placa de acero inoxidable de 96 pocillos para IVD Bruker Daltonik IVD MALDI Biotyper
- Microtubos eppendorf 1.5 ml

4.6.3. Reactivos:

- Ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (HCCA) (Bruker)
- Acetonitrilo 99,9% (J.T. Baker)
- Agua ultrapura HPLC (J.T. Baker)
- Etanol absoluto (Fluka Analytical)
- Ácido fórmico 70% (Fluka Analytical)
- Ácido trifluoroacético absoluto (Sigma Lab)
- Test bacteriano estándar de Bruker (Bruker Bacterial Test Standard-BTS)

4.7. PROCESO

- Determinación de resultados de EGO con sospecha de ITU en 248 muestras de pacientes tanto externos como internos del Instituto, en donde se tomó en cuenta parámetros como: nitritos, bacterias y leucocitos.
- Separación de muestras de orina seleccionadas para análisis por método MALDI-TOF. Todas las muestras fueron sembradas en agar sangre y MacConkey, se incubaron en un ambiente aeróbico a 37°C durante 24h para su posterior comparación. Las muestras de las placas que dieron como resultado negativas se desecharon.
- Elaboración de BTS (Bruker Bacterial Test Estándar), es un extracto de *E. coli* con dos proteínas de alto peso molecular que se ha desarrollado para el proceso de control de calidad. Cuando se utiliza el BTS, MALDI realiza

un control de calidad automático antes de cada funcionamiento de la identificación. El proceso del control de calidad incluye la calibración del espectrómetro total, un chequeo para ajuste del laser y una evaluación de la calidad del espectro. El rendimiento del sistema finalmente se confirma mediante la obtención de la identificación de *Escherichia coli*. El resultado se documenta en cada informe de ejecución de la identificación (Protocolo de elaboración- Ver anexo 9.1).

- Elaboración de Matriz HCCA, es una mezcla de ácidos orgánicos que sirven para cocristalizar la muestra depositada en la placa metálica, ayudar en el tiempo de vuelo y obtener un mejor espectro (Protocolo de elaboración-Ver anexo 9.2).
- Procesamiento de las muestras a través del protocolo de extracción de orina por método MALDI-TOF (Ver Anexo 9.3).
- Las muestras fueron analizadas en el software de Autoflex III MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Leipzig, Alemania) equipado con un láser SmartBeam de 200 Hz con un rango de 2,000-20,000 Da. Para cada espectro, se recolectaron y analizaron 500 disparos láser, los espectros fueron calibrados externamente usando la mezcla estándar.
- Reporte final: se tomaron en cuenta los resultados de identificación por método MALDI-TOF con un score mayor a 2, el cual es considerado como confiable.
- Comparación de resultados de método MALDI TOF con método por urocultivo, obtención de concordancia a través de la aplicación de Kappa de Cohen.

4.8. PLAN DE TABULACION Y ANALISIS

Los datos se procesaron y tabularon con el programa Excel y SPSS 15.0.

4.9. ASPECTOS ÉTICOS

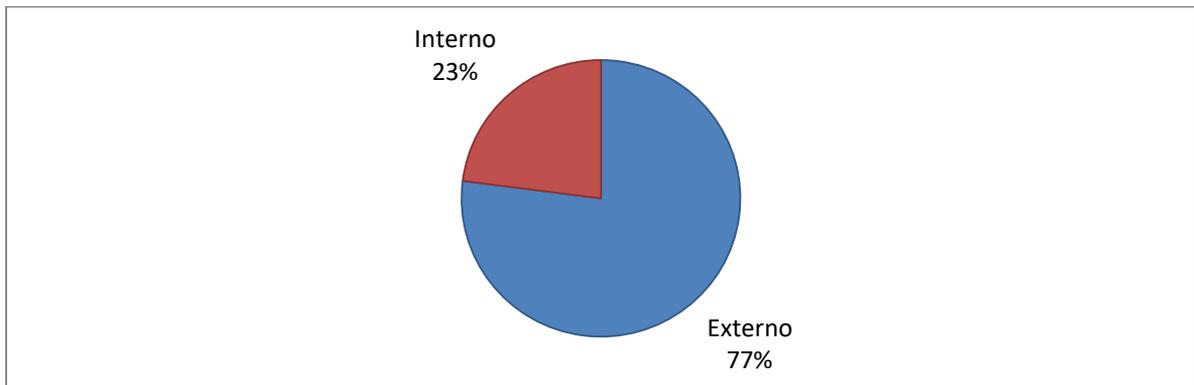
La información y resultados de la investigación fueron guardados con absoluta confidencialidad y responsabilidad, garantizando que no se expondrá a los

participantes a actos perjudiciales. Los resultados se utilizaron únicamente en este estudio.

CAPÍTULO V

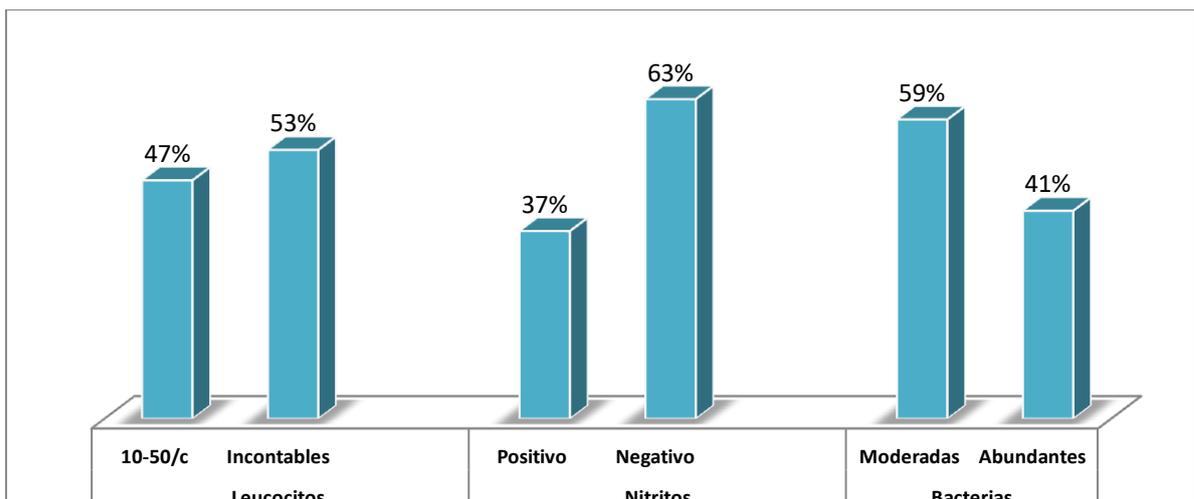
5. RESULTADOS

Gráfico 1. Pacientes del Instituto Nacional de Cancerología



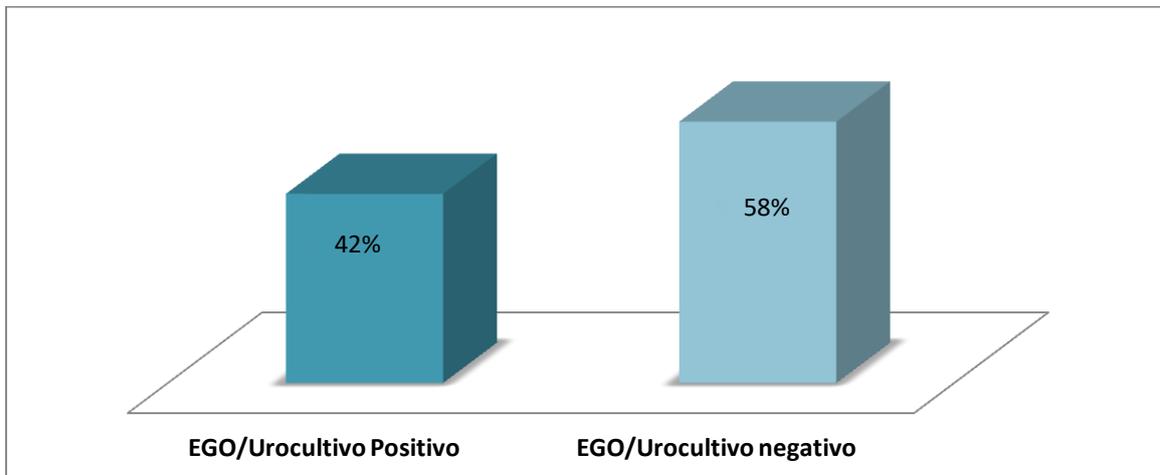
Se analizaron 248 muestras de orina, de las cuales el mayor porcentaje fué de pacientes externos del Instituto Nacional de Cancerología en un 77%.

Gráfico 2. Parámetros utilizados en el Examen General de Orina como Criterios de Inclusión



Los parámetros del Examen General de Orina con mayor porcentaje en las muestras analizadas fueron leucocitos incontables en un 53%, bacterias moderadas en un 59% y nitritos negativo en un 63%.

Gráfico3. Relación entre las 248 muestras seleccionadas en el Examen General de Orina y los resultados del Urocultivo



El 42% de muestras seleccionadas a través de los criterios de inclusión por el Examen General de Orina resultaron con urocultivo positivo.

Tabla 1. Resultados de las muestras analizadas por MALDI-TOF y Urocultivo

	Positivo	Negativo	Identificación no confiable (INC)*	Total
MALDI TOF	81	146	21	248
Urocultivo	102	146	0	248

*Aplica para metodología MALDI-TOF

Del análisis de 248 muestras de orina se obtuvo 146 muestras con resultado negativo en la identificación de microorganismos tanto por MALDI-TOF como por urocultivo, 102 muestras fueron positivas por urocultivo y 81 muestras por MALDI-TOF, 21 muestras obtuvieron identificación no confiable (INC) por método MALDI-TOF.

Tabla 2. MALDI-TOF y Urocultivo, microorganismos identificados.

Microorganismo	Identificación MALDI-TOF	Identificación UROCULTIVO	No identificadas por MALDI-TOF*	Correlación %
<i>Escherichia coli</i>	63	67	4 ^a	94
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	1	0	100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	9	3 ^b	67
<i>Morganella morganii</i>	1	1	0	100
<i>Proteus mirabilis</i>	4	4	0	100
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3	3	0	100
<i>Citrobacter freundii</i>	1	1	0	100
<i>Proteus vulgaris</i>	1	1	0	100
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0	1	1*	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	1	1*	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	1	1*	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	1	1*	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	1	0	100
TOTAL	81	102	21	96

*Resultados obtenidos como Identificación no confiable (INC) por parte del método MALDI-TOF, por lo cual se consideró como no identificadas.

a. Muestras con 2 microorganismos: *Escherichia coli* + *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* + *Escherichia coli*, *Escherichia coli* + *Providencia rettgeri*, *Proteus mirabilis* + *Escherichia coli*.

b. Muestras con 2 microorganismos: *Klebsiella pneumoniae* + *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* + *Escherichia coli*, 1 muestra con INC.

A través del método MALDI-TOF se identificaron 81 microorganismos, de los cuales los de mayor prevalencia fueron *Escherichia coli* (63 muestras) con una correlación del 94% con el urocultivo, *Klebsiella pneumoniae* (6 muestras) con una correlación del 67%, *Proteus mirabilis* (4 muestras) con una correlación del 100%, 21 muestras no fueron identificadas, de las cuales 10 se encontraban con 2 microorganismos y 11 muestras obtuvieron una identificación no confiable (INC).

Tabla 3. Aplicación de medida de concordancia Kappa de Cohen entre Método MALDI-TOF y Urocultivo

	Valor
Medida de acuerdo Kappa	0,820
N de casos válidos	248

Con la aplicación de medida de concordancia Kappa de Cohen se obtuvo un valor de 0,820 el cual indica un valor de concordancia muy buena entre las dos metodologías.

Tabla 4. Principales parámetros en la descripción de la prueba diagnóstica por método MALDI TOF

MALDI TOF	UROCULTIVO		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	a) 81	b) 0	81
Negativo	c) 21	d) 146	167
Total	102	146	248

Considerando los resultados del urocultivo como “gold estándar” se estableció parámetros para la descripción de MALDI-TOF como método diagnóstico rápido en el cual se obtuvo una sensibilidad del 79%, especificidad 100%, Valor Predictivo Negativo (VPN) 87,4% y Valor Predictivo Positivo (VPP) 100%.

CAPÍTULO VI

6. DISCUSIÓN

La Espectrometría de Masas ha demostrado ser muy útil para la identificación de microorganismos, por lo que se han creado diferentes plataformas para este fin en los laboratorios de microbiología. ⁽⁹⁾⁽¹⁹⁾⁽²²⁾⁽³¹⁾

Estudios previos han demostrado que la espectrometría de masas por MALDI-TOF basada en la identificación del perfil proteico es un método confiable para la identificación de microorganismos ya que la comparación se hace con alrededor de 6,000 espectros. ⁽⁹⁾⁽¹⁹⁾⁽²²⁾⁽³¹⁾

Otros estudios demuestran una correlación muy buena entre MALDI-TOF y método convencional, sin embargo en la mayoría de casos esto se demuestra para aislamientos de bacterias y hongos en muestras previamente sembradas o por extracción en muestras de hemocultivos. ⁽⁹⁾⁽¹⁵⁾⁽²¹⁾

El 92% de las muestras utilizadas en este estudio fueron analizadas correctamente por Método MALDI-TOF, de las cuales el 59% fueron reportadas como negativas y coincidieron en su totalidad con el urocultivo.

El 8% de las muestras no fueron identificadas por MALDI-TOF, de las cuales el 4% presentaban dos microorganismos. La comparación del análisis de muestras de orina por MALDI-TOF y el Urocultivo en este estudio demostró un valor de concordancia muy buena utilizando el índice Kappa, lo cual coincide con un estudio realizado por Ferreira y colaboradores donde se habla del análisis a partir de diferentes muestras clínicas y muestran una excelente correlación entre las identificaciones llevadas a cabo en los dos métodos. ⁽⁹⁾⁽¹⁴⁾

Diferentes estudios han demostrado resultados concordantes con la identificación obtenida por los métodos convencionales, es el caso de Bizzini et al., donde se analizaron 1,371 muestras y la identificación global fue del 95%, Sogawa et al., analizaron 498 muestras con una identificación global del 91%, como podemos observar el porcentaje de identificación es muy alto ya que la identificación se

realiza a partir de diferentes muestras clínicas pero que ya fueron previamente sembradas y se trabaja con sus colonias. ⁽³⁷⁾

Un estudio realizado con 229 microorganismos gramnegativos y 65 grampositivos demuestra una correlación del 87.8% y 100%, respectivamente, si comparamos con los resultados de este estudio donde la correlación para gramnegativos fue del 87,3% vemos mucha similitud, la correlación para grampositivos fue solo del 50% pero es importante recalcar que solo se obtuvo 2 microorganismos grampositivos en el análisis de muestras. ⁽¹⁰⁾

El porcentaje de identificación total de las 248 muestras de orina analizadas en este estudio fue del 92%, el cual comparado con otro estudio realizado por Ferreira et al., ⁽⁹⁾ bajo similares condiciones y que solo incluye muestras de orina a diferencia de los anteriores donde trabajan con diferentes muestras clínicas el resultado es de 92.25% con lo cual podemos hablar de una excelente correlación entre MALDI TOF y el método convencional, el urocultivo.

Se utilizó parámetros para la descripción de MALDI-TOF como método diagnóstico rápido en el cual se obtuvo una sensibilidad del 79%, especificidad 100%, VPN 87.4% y VPP 100%.⁽²⁾

Con estos porcentajes podemos decir que MALDI-TOF es un método muy específico pero no del todo sensible, lo que coincide con un estudio de Muñoz et al. ⁽²¹⁾

Los resultados de MALDI-TOF nos habla de un sistema de identificación fiable, con una ganancia de 18-48horas en la mayoría de casos, aunque muchos coinciden que la identificación sin perfiles de sensibilidad para antibióticos es una de sus importantes limitaciones, la identificación rápida favorece la inferencia de probables perfiles de sensibilidad y ajustar tratamientos empíricos. ⁽⁹⁾

Actualmente, también se habla de incluir métodos que permiten detectar la presencia de enzimas capaces de hidrolizar a determinados antimicrobianos, discriminar cepas resistentes y detectar la presencia de BLEE. ⁽¹⁵⁾⁽²¹⁾

A pesar de que se necesita una fuerte inversión previa para el instrumento que utiliza MALDI-TOF cada vez más laboratorios lo incluyen en su rutina debido a su sistema de fácil manejo y consumo de reactivos casi mínimo. ⁽¹⁰⁾

La posibilidad de que se pueda analizar directamente las muestras, acortar tiempos de diagnóstico, proponer la terapia adecuada infiriendo con tratamiento antibiótico para microorganismos que ya han sido analizados y poseen su perfil de susceptibilidad como es en el caso del Instituto Nacional de Cancerología ⁽³²⁾ justificaría la utilización de esta metodología.

CAPÍTULO VII

7. CONCLUSIONES

- La identificación de microorganismos a partir de muestras de orina por método de extracción MALDI-TOF fué exitosa en un 92%.
- El índice Kappa muestra un valor de concordancia muy bueno (0,820) entre MALDI-TOF y el urocultivo.
- MALDI-TOF se puede considerar como un método rápido y confiable para la identificación de microorganismo por método de extracción en orina.

CAPÍTULO VIII

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Benítez R, Jiménez S. (2013) *Infección del tracto urinario*. *Pediatría integral*.17,402-11
2. Bravo S, Cruz J. (2015) *Estudios de exactitud diagnóstica: Herramientas para su Interpretación*. *Revista Chilena de Radiología*. 21,158-64.
3. Bou G, Fernández A, García C, Sáez J, Valdezate S. (2011) *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*. Elsevier España and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 29, 601–08
4. Calderón E et al. (2013) *Diagnosis and treatment of urinary tract infections: a multidisciplinary approach for uncomplicated cases*. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*.70,3-10.
5. Claydon M, Davey S, Edwards J, Gordon D. (1996) *The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry*. *Nature Biotechnology*.14, 1584-86.
6. Corna A, García F, Aixa A, Mariano H, Ramos M. (2002) *Aspectos Generales de la Infección Urinaria Nosocomial*. *Revista de Posgrado de la Vía Cátedra de Medicina*.13, 6-8.
7. Cueto M. (2002) *Diagnóstico microbiológico de la infección del tracto urinario*. *Departamento de Microbiología*. Elsevier España and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.4,9-14.
8. Echevarría Y, Sarmiento E, Osoreo F. *Urinary tract infection and antibiotic treatment*. *Acta Médica Peruana*.23, 26-31.
9. Ferreira L, Sanchez J, González M, Cembrero D, Herrero A, González J, Muñoz J. (2010) *Direct Identification of Urinary Tract Pathogens from Urine Samples by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry*. *Journal of Clinical Microbiology*. 48, 1-6.

10. Ferreira L, Sánchez F, González M, Herrero A, Muñoz M, González M, Muñoz J. (2009) *Identificación bacteriana mediante espectrometría de masas matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight. Comparación con la metodología habitual en los laboratorios de Microbiología Clínica*. Elsevier España. 28, 492-97.
11. García P, Allende F, Legarraga P, Huilcaman M, Solari S. (2012) *Identificación bacteriana basada en el espectro de masas de proteínas: Una nueva mirada a la microbiología del siglo XXI*. Revista Chilena de Infectología. 29, 263-72.
12. González Alberto et al. (2014). *Infeción de las vías urinarias: prevalencia, sensibilidad antimicrobiana y factores de riesgo asociados en pacientes con diabetes mellitus tipo 2*. Revista Cubana de Endocrinología. 25, 57-65.
13. Grigoryan L, Trautner BW, Gupta K. (2014) *Diagnosis and management of urinary tract infections in the outpatient setting: a review*. Jama.312, 1677-84.
14. Holland R, Wilkes J, Rafii J, Sutherland C, Persons K. (1996). *Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry* Rapid Commun Mass Spectrom. Medline. 10, 1227-32
15. Jordana, E, Martró E, Ausina V. (2012) *La espectrometría de masas en el laboratorio de microbiología clínica*. Elsevier España. 30, 635-644.
16. Lozano C. (2016) *Examen general de orina: una prueba útil en niños*. Revista de la Facultad de Medicina UNAM. 64,137-47.
17. Maldonado M. (2013) *Infecciones en el paciente oncológico*. Revista española de pediatría. 69,140-154.
18. Manrique F, Rodríguez J, Ospina J. (2014) *Rendimiento diagnóstico del parcial de orina como predictor de infección urinaria en pacientes de Tunja, Colombia*. Revista CES Medicina. 28,21-34

19. March G, Rodriguez M, Ortiz R, Orduña A, Bratos M. (2015) *New procedure for rapid identification of microorganisms causing urinary tract infection from urine samples by mass spectrometry (MALDI-TOF)*. Elsevier España. 33, 89–94
20. Molina J, Manjarrez A. (2014) *Infecciones de vías urinarias - Escherichia coli*. Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM.
21. Muñoz J, Gonzáles J. (2015) *Espectrometría de masas MALDI-TOF en microbiología clínica. Situación actual y perspectivas futuras*. Elsevier España. 33, 369-71.
22. Neelja S, Manish K, Pawan K, Jugsharan S. (2015) *MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis*. *Frontiers in Microbiology*. 1-16
23. OMS. (2011) *Estadísticas Sanitarias mundiales*.
24. Orrego C, Henao C, Cardona J. (2014) *Prevalence of urinary infection, uropathogens and antimicrobial susceptibility profile*. *Acta Médica Colombiana*. 39
25. Palomino C, González Y. (2014) *Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 31, 535-46.
26. Pigrau C. (2013) *Infección del tracto urinario*. Elsevier España. 31, 614-24
27. Puerta A, García, Mateos F. (2010) *Enterobacterias*. Actualización. 3426-31.
28. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, LaScola B, Fournier P, Rolain J, et al. (2009) *Ongoing revolution in bacteriology: Routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*. *Clinical Infection Diseases Journal*. 49, 543–51
29. Signor L, Boeri E. (2013) *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometric Analysis of Intact Proteins Larger than 100 kDa*. *Journal of Visualized Experiments*. 79, 1-7

30. Subcommittee on urinary tract infection and steering committee on quality improvement and management. (2011) *Urinary tract infection: clinical practice guideline for the diagnosis and management of the Initial UTI in Febrile Infants and children 2 to 24 months*. Pediatrics. 128, 595-10.
31. Vega S, Sanchez F, Ferreira L, Gonzáles J, Muñoz J. (2016) Is MALDI-TOF Mass Spectrometry a Valuable New Tool for Microorganisms Epidemiology. Journal of Proteomics & Bioinformatics. 9, 232-37.
32. Velázquez C, Cornejo P, Volkow P. (2016) *Resistencia bacteriana de cultivos de orina en un hospital oncológico: seguimiento a diez años*. Salud Pública de México. 8,446-52
33. White B. (2011) *Diagnosis and Treatment of Urinary Tract Infections in Children*. American Family Physician Journal.83, 409-15.
34. Zárate M, Romano V, Nievas J, Smayevsky J. (2014) *Utilidad de la espectrometría de masas MALDI-TOF en la identificación de bacterias anaerobias*. Revista Argentina de Microbiología.46,98-102

CAPÍTULO IX

9. ANEXOS

9.1 Protocolo de elaboración de BTS (Bruker Bacterial Test Estándar)

9.2 Protocolo de elaboración de Matriz HCCA

9.3 Protocolo de extracción de orina por método MALDI-TOF

ANEXO 9.1 Protocolo de elaboración de BTS (Bruker Bacterial Test Estándar)

- Preparar solvente orgánico en cabina de seguridad.
- En un tubo ependorff de 1,5 ml depositar 475 µl de H₂O.
- Agregar 500 µl de Acetonitrilo.
- Agregar 25 µl de ácido trifluoroacético.
- Homogenizar
- Tomar 50 µl del solvente orgánico preparado y agregar en el tubo de BTS, homogenizar con pipeta 20 veces cuidando de no hacer burbujas.
- Dejar reposar por 5 minutos
- Homogenizar nuevamente.
- Hacer alícuotas de 5 µl y refrigerar a 4°C.

ANEXO 9.2 Protocolo de elaboración de Matriz HCCA

- Atemperar el tubo matriz por 15 minutos.
- Preparar el solvente orgánico
- Tomar 250 μ l del solvente orgánico e hidratar la matriz.
- Homogenizar en el vórtex por 1 minuto.
- Proteger de la luz con papel aluminio
- Fijarse que no queden precipitados cada que se utilice, homogenizar en el vórtex si es necesario.

ANEXO 9.3 Protocolo de Extracción de orina por método MALDI-TOF

- Tomar 1ml del líquido estéril (orina) y colocar en un tubo ependorff y centrifugar 30 segundos a 5,500 rpm.
- Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo ependorff y centrifugar 5 minutos a 15,200 rpm.
- Decantar el sobrenadante
- Agregar 200 μ l de Agua ultraoura (HPLC) y resuspender el botón y centrifugar 2 minutos a 15,200 rpm
- Agregar 900 μ l de etanol absoluto y resuspender el botón y centrifugar 2 minutos a 15,200 rpm.
- Secar el excedente en papel absorbente, y dejarlo por 5 minutos al ambiente.
- Centrifugar 2 minutos nuevamente a 15,200 rpm.
- Agregar 50 μ l de ácido fórmico (70%) y resuspender el botón.
- Agregar 50 μ l de acetonitrilo (99,9%) y centrifugar por 2 minutos a 15,200 rpm.
- Colocar en la placa de MALDI-TOF 1,5 μ l del sobrenadante y esperar a que seque.
- Agregar 1,5 μ l de matriz y esperar a que seque.
- Ingresar la placa al equipo.