

Evaluación de la presencia de microorganismos en la orina de personas sanas y con patología urinaria mediante diferentes técnicas de cultivo

Lic. Rafael Sauto Vinicio

Tesis de Maestría en Biotecnología



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy

POSGRADO EN
BIOTECNOLOGÍA

2024

Evaluación de la presencia de microorganismos en la orina de personas sanas y con patología urinaria mediante diferentes técnicas de cultivo

Lic. Rafael Sauto Vinicio

Tesis de Maestría en Biotecnología

2024

Orientadora Dra. Paola Scavone

Laboratorio de Biofilms Microbianos, Depto. de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE)

Co-orientadora Dra. Luciana Robino

Unidad Académica de Bacteriología y Virología, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Udelar

AGRADECIMIENTOS

Claramente no me da una carilla para agradecer a todos los que han colaborado en este trabajo de realización de tesis de Maestría.

En primer lugar agradezco a las orientadoras de la tesis: Paola y Luciana, que supieron guiarme, orientarme, con mucha paciencia, perseverancia y empeño para llevar adelante de la mejor manera todo el proceso. Agradezco a la ANII por la beca que hizo posible el sustento económico, importante para llevar adelante el trabajo.

A mis padres, Martha y Daniel, que son sin dudas el sostén de siempre con todo desde el principio, manteniendo optimismo en el camino que recorrí y recorreré, “abuelando” con mi peque Vicente. Terminaba el grado de la licenciatura cuando él nació y hoy con 12 años, con mucho aprendizaje y experiencia de papá terminando otra etapa más: “la maestría”, es el eje que me impulsa día a día con esa energía radiante. A mi hermana Romi que me ha escuchado y regalado libros de autoayuda para convencerme de que todo es posible.

A Erlen del IIBCE, una compañera muy capaz y sana que me ha ayudado en los comienzos de la tesis. A Ceci del Instituto de Higiene, gran compañera, laboradora y futura médica. A Claudia del IIBCE por sus críticas y correcciones durante la evaluación en la presentación y los avances del proyecto. A Walter, gran estadístico de la Facultad de Ciencias. A la secretaria Gabriela de Posgrado en Biotecnología por sus respuestas y apoyo continuo con los cursos y a la comisión, las coordinadoras Andrea y Mabel. Al urólogo Javier por su apoyo en este trabajo. A Loreley del IIBCE, amiga y gran colega en la etapa final del posgrado.

Agradezco profundamente a todos los voluntarios que donaron su muestra de orina para este estudio.

A todos mis ex-compañeros del Laboratorio de Microbiología del Hospital de Clínicas: Beatriz, Graciela, Malva, Pilar, Cecilia, Daniel, Anita, Aracé y Verónica.

A mis amigos que me han bancado y bancan como siempre: Rafa padrino de Vice, Pilar, Silvia, Gonza, Guille, Javi, Diego, Nando, Marto, Joaco, Martín, Emilio, Ze y Toto.

A Marcel por su gran dedicación y colaboración en la etapa de resultados durante el proceso.

A Omar y Santiago, por su gran apoyo incondicional y sostén en el laboratorio actual en la Facultad de Agronomía.

A Pablo por su colaboración desde CENUR-Salto.

A todos mis compas actuales de laburo que de una manera u otra me han ayudado en este recorrido: Cami, Vale, Mauro, Sele, Esteban, Guille, Tito, Andrés, Melanie, Magui, Gustavo, Jorge, Mariana, Martita y las grandes secretarías Dorita y Moni.

A Gonzalo y Franco, por mantener mi integridad mental y física semana a semana.

FINANCIACIÓN

Este trabajo fue financiado por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) a través del Proyecto de investigación Fundamental Fondo Clemente Estable - 2019 (FCE_1_2019_1_155481).

También recibió apoyo económico del Posgrado de Biotecnología (Facultad de Ciencias, UdelaR) a través de las alícuotas para apoyo a tesis.

El trabajo se enmarca en el proyecto de investigación “Caracterización de la microbiota urinaria y sus implicancias clínicas en niños y adultos”. ANII-Fondo Clemente Estable (FCE_1_2019_1_155481).

DIFUSIÓN DE RESULTADOS

Evaluación de la presencia de microorganismos en orina en personas sanas mediante urocultivo estándar y expandido (2021). Sauto R, Robino L, Scavone P. Congreso Latinoamericano de Microbiología (ALAM). Asunción, Paraguay.

Evaluación de la presencia de microorganismos en la orina de personas sanas y con patología urinaria mediante diferentes técnicas de cultivo (2022). Sauto R, Morales C, Robino L, Scavone P. III Congreso de Biociencias (SUB). Montevideo, Uruguay.

Microbiota del aparato urinario bajo: el eslabón perdido (2022). Neffa F, Sauto R, Morales C, Zeballos J, Robino L, Scavone P. X Congreso Uruguayo y Jornadas Rioplatenses de Urología. Colonia del Sacramento, Colonia, Uruguay.

Estudios de Microbiota urinaria en personas asintomáticas y sintomáticas ¿Qué tienen los microorganismos para decir? (2022). Scavone P, Sauto R, Morales C, Robino L. XLIV Sociedad de Microbiología de Chile (Somich). La Serena, Chile.

Are urine bacteria in children always bad? (2024). Robino L, Sauto R, Morales C; Scavone P. European Society for Pediatric Infectious disease Meeting. Copenhagen, Dinamarca.

Robino L, Sauto R, Morales C, Navarro N, González MJ, Cruz E, Neffa F, Zeballos J, Scavone P. (2024). Presence of intracellular bacterial communities in uroepithelial cells, a potential reservoir in symptomatic and non-symptomatic people. *BMC Infect Dis* 24, 590.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	3
FINANCIACIÓN	4
DIFUSIÓN DE RESULTADOS	4
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUCCIÓN	13
1.1 Conceptos generales de la microbiota	13
1.2 La microbiota urinaria	16
1.3 Infección del tracto urinario	18
1.3.1 Conceptos principales	18
1.3.2 Métodos diagnósticos de laboratorio	20
1.3.3 Epidemiología	24
1.3.4 Agentes etiológicos	25
1.3.5 Patogenia	25
1.4 Comunidades bacterianas intracelulares	28
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO	30

3. OBJETIVOS	30
4. MATERIALES Y MÉTODOS	31
4.1 Población de estudio	31
4.2 Muestreo de orina	33
4.3 Aislamiento de los microorganismos en las muestras de orina por las técnicas de cultivo UE y EQUC	33
4.4 Técnica de recuperación de las bacterias intracelulares por cultivo mediante ensayo de protección con gentamicina	35
4.5 Identificación de los microorganismos aislados de UE, EQUC y de los cultivos de intracelulares por espectrometría de masas MALDI-TOF	35
4.6 Evaluación de bacterias intracelulares por microscopía	36
4.6.1 Preparación de las muestras de orina para su visualización microscópica	36
4.6.2 Tinción de May-Grünwald-Giemsa y detección de las células epiteliales en orina por microscopía óptica	36
4.6.3 Tinción de inmunofluorescencia	37
4.6.4 Microscopía láser confocal y adquisición de imágenes	38
4.7 Análisis estadístico de los resultados obtenidos	38
5. RESULTADOS	39
5.1 Identificación de los microorganismos de la microbiota urinaria	39
5.1.1. Frecuencia de los microorganismos identificados	

en el total de las muestras estudiadas	39
5.1.2. Frecuencia de los microorganismos encontrados en la orina según la presencia/ausencia de síntomas de ITU	41
5.1.3. Frecuencia de los microorganismos encontrados en la orina según la edad	45
5.1.4. Frecuencia de los microorganismos encontrados en la orina según el sexo	47
5.2 Comparación de las metodologías empleadas para recuperar microorganismos de las muestras de orina	49
5.3 Identificación de los microorganismos intracelulares presentes en la orina	54
5.3.1. Detección de bacterias intracelulares en células descamadas en orina	54
5.3.2. Agentes etiológicos encontrados intracelularmente y comparación con los microorganismos presentes en el urocultivo estándar	57
6. DISCUSIÓN	59
7. CONCLUSIONES	69
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
ANEXOS	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Epidemiología de la infección del tracto urinario	25
Figura 2: Patogenia de la infección del tracto urinario	27
Figura 3: Proceso de formación de comunidades bacterianas intracelulares	29
Figura 4: Esquema de la población de estudio	32
Figura 5: Esquema de procesamiento de las muestras de orina	34
Figura 6: Frecuencia de los microorganismos aislados en muestras de orina de la población de estudio	40
Figura 7: Frecuencia de los microorganismos aislados en la población de individuos asintomáticos y sintomáticos	42
Figura 8: Distribución de los microorganismos en cada individuo según presencia/ausencia de síntomas de ITU	44
Figura 9: Frecuencia de los microorganismos aislados en la orina según la edad de los individuos	45
Figura 10: Distribución de los microorganismos según presencia/ausencia de síntomas de ITU y la edad de la población	46
Figura 11: Frecuencia de los microorganismos aislados en la orina según el sexo de los individuos	47
Figura 12: Distribución de los microorganismos según presencia/ausencia de síntomas de ITU y el sexo de la población de estudio	48
Figura 13: Aislamientos obtenidos por UE y EQUC	50
Figura 14: Número de urocultivos positivos en la población adulta	51
Figura 15: Número de urocultivos positivos en la población adulta de acuerdo a la presencia/ausencia de síntomas de ITU	52
Figura 16: Número de urocultivos positivos en la población pediátrica	53
Figura 17: Número de urocultivos positivos en la población pediátrica de acuerdo a la presencia/ausencia de síntomas de ITU	54
Figura 18: Microscopía láser confocal en bacterias intracelulares	56
Figura 19: Distribución de las bacterias intracelulares identificadas por MALDI-TOF	58

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACh: Agar Chocolate
- ADN: Ácido Desoxirribonucleico
- AMc: Agar MacConkey
- ARNr: Ácido Ribonucleico ribosomal
- AS: Agar Sangre
- CBI: Comunidades Bacterianas Intracelulares
- CNA: Ácido Nalidíxico y Colistina
- EQUC: Urocultivo Cuantitativo Expandido
- HMP: Proyecto del Microbioma Humano
- ITS: Infecciones de Transmisión Sexual
- ITU: Infecciones del Tracto Urinario
- LB: Caldo de Luria Bertani
- MALDI-TOF: Desorción/ionización láser asistida por matriz
- MGG: May-Grünwald-Giemsa
- MLC: Microscopía Láser Confocal
- MRS: Agar Man Rogose Sharpe
- PBS: Tampón Fosfato Salino
- PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
- TA: Temperatura Ambiente
- UE: Urocultivo Estándar
- UFC: Unidades Formadoras de Colonia
- UPEC: *E. coli* Uropatogénico
- UPIII: Uroplaquina III
- WGA: wheat germ aglutining

RESUMEN

La microbiota es el conjunto de microorganismos que residen en un ambiente determinado. La microbiota urinaria fue descubierta en 2012, desafiando el concepto de que la orina vesical es estéril. Esta microbiota difiere entre mujeres y varones en composición y complejidad. Puede influir en enfermedades urológicas y modular la respuesta inmune. La infección del tracto urinario (ITU) se define como la presencia de patógenos en el tracto urinario en pacientes con síntomas compatibles. Es más común en mujeres y *E. coli* es el patógeno más frecuente. Concomitantemente, se ha reportado la presencia de comunidades bacterianas intracelulares, generalmente asociadas a personas con infección urinaria recurrente. Las bacterias permanecen dentro de las células escapando así a: la detección por el urocultivo, la acción de los antimicrobianos y al sistema inmune. El presente trabajo tiene como objetivo general estudiar la microbiota asociada al tracto urinario en personas sanas y en pacientes con síntomas urinarios e investigar bacterias intracelulares en las células uroepiteliales de descamación de la vejiga. Ciento cuarenta y un individuos fueron incluidos en el estudio, 72 asintomáticos y 69 sintomáticos. De los mismos, 91 eran adultos (46 mujeres y 45 varones) y 50 pediátricos -menores a 15 años- (31 niñas y 19 varones). La muestra de orina se recolectó por la técnica de chorro medio. Las muestras de orina se cultivaron con distintas metodologías (urocultivo estándar-UE- y urocultivo expandido-EQUC-) para evaluar la presencia de bacterias cultivables y su posterior identificación por MALDI-TOF. La presencia de bacterias intracelulares fue evaluada mediante citocentrifugación, tinción clásica de May-Grunwald Giemsa y de fluorescencia para la visualización mediante microscopía láser confocal. Se identificaron 66 especies bacterianas distintas en el total de los aislamientos, siendo los géneros-especies más frecuentes: *Staphylococcus spp*, *E. coli*, *E. faecalis*. En individuos asintomáticos predominó *Staphylococcus spp* y en sintomáticos, *E. coli* y *Klebsiella spp*. En mujeres predominó *E. coli* y en varones, *Staphylococcus spp* y *E. faecalis*. EQUC demostró ser más efectivo en la detección de microorganismos que UE para conocer la microbiota urinaria, especialmente en varones adultos y en individuos asintomáticos. Se detectaron bacterias intracelulares en 51% de las muestras y su asociación con síntomas clínicos fue significativa en mujeres. Este estudio revela una riqueza de bacterias capaces de invadir las células del tracto urinario, con algunas asociaciones significativas entre especies bacterianas específicas (*E.coli* y *Staphylococcus spp*) y la presencia o ausencia de síntomas. En conclusión, el aparato urinario bajo está habitado por una microbiota propia, derribando el mito de que es estéril. Algunos pacientes presentan además, bacterias intracelulares no detectables por métodos diagnósticos clásicos y protegidas del efecto de los antimicrobianos, que podrían explicar la sintomatología en pacientes con patologías crónicas de etiología incierta. Se sugiere el uso de EQUC para investigar la microbiota urinaria, la necesidad de estudios prospectivos y el uso de métodos de secuenciación del gen ARNr 16S para comprender mejor el urobioma y desarrollar nuevas estrategias preventivas y terapéuticas.

Palabras clave:

Microbiota urinaria, infección del tracto urinario -ITU-, bacterias intracelulares, urocultivo estándar -UE-, urocultivo cuantitativo expandido -EQUC-

ABSTRACT

The microbiota is the set of microorganisms that reside in a specific environment. The urinary microbiota was discovered in 2012, challenging the concept that bladder urine is sterile. This microbiota differs between women and men in composition and complexity. It can influence urological diseases and modulate the immune response. Urinary tract infection (UTI) is defined as the presence of pathogens in the urinary tract in patients with compatible symptoms. It is more common in women, and *E. coli* is the most frequent pathogen. Concomitantly, the presence of intracellular bacterial communities has been reported, generally associated with people with recurrent urinary infection. The bacteria remain inside the cells, thus escaping detection by urine culture, antimicrobial action, and the immune system. The present work aims to study the microbiota associated with the urinary tract in healthy people and patients with urinary symptoms and to investigate intracellular bacteria in bladder desquamation uroepithelial cells. One hundred and forty-one individuals were included in the study, 72 asymptomatic and 69 symptomatic. Of these, 91 were adults (46 women and 45 men) and 50 pediatric -under 15 years old- (31 girls and 19 boys). The urine sample was collected using the midstream technique. Urine samples were cultured using different methodologies (standard urine culture -SUC- and expanded urine culture -EQUC-) to evaluate the presence of culturable bacteria and their subsequent identification by MALDI-TOF. The presence of intracellular bacteria was evaluated by cytocentrifugation, classic May-Grunwald Giemsa staining, and fluorescence for visualization by confocal laser microscopy. Sixty-six different bacterial species were identified in the total isolates, with the most frequent genera-species being: *Staphylococcus spp*, *E. coli*, *E. faecalis*. In asymptomatic individuals, *Staphylococcus spp* predominated, and in symptomatic individuals, *E. coli* and *Klebsiella spp*. In women, *E. coli* predominated, and in men, *Staphylococcus spp* and *E. faecalis*. EQUC proved to be more effective in detecting microorganisms than SUC for understanding the urinary microbiota, especially in adult males and asymptomatic individuals. Intracellular bacteria were detected in 51% of the samples, and their association with clinical symptoms was significant in women. This study reveals a richness of bacteria capable of invading urinary tract cells, with some significant associations between specific bacterial species (*E.coli* and *Staphylococcus spp*) and the presence or absence of symptoms. In conclusion, the lower urinary tract is inhabited by its own microbiota, debunking the myth that it is sterile. Some patients also present intracellular bacteria that are undetectable by classical diagnostic methods and protected from the effect of antimicrobials, which could explain the symptomatology in patients with chronic pathologies of uncertain etiology. The use of EQUC is suggested to investigate the urinary microbiota, the need for prospective studies, and the use of 16S rRNA gene sequencing methods to better understand the urobiome and develop new preventive and therapeutic strategies.

Keywords:

Urinary microbiota, urinary tract infection -UTI-, intracellular bacteria, standard urine culture -SUC-, expanded quantitative urine culture -EQUC-

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Conceptos generales de la microbiota.

El término microbiota se refiere a la comunidad de microorganismos vivos que residen en un ambiente determinado, mientras que el término microbioma se define como los genomas, genes y metabolitos de los microorganismos presentes en un hospedero y las condiciones ambientales (Turnbaugh et al., 2007; Del Campo-Moreno et al., 2018; Hou et al., 2022).

Estos microorganismos se clasifican en comensales, mutualistas, simbiotes, saprófitos o parásitos y coexisten en diversas partes del cuerpo humano (intestino, cavidad bucal, piel, pulmones, vagina) constituyendo la microbiota humana, que aporta 150 veces más información genética que la de todo el genoma humano (Del Campo-Moreno et al., 2018; Hou et al., 2022).

La influencia de la microbiota en nuestro estado de salud y enfermedad actúa en varias direcciones: puede inducir o modificar enfermedades metabólicas, autoinmunes y neurodegenerativas así como regular la respuesta inmune del hospedero y modular las interacciones farmacológicas (El-Sayed et al., 2021).

Conceptualmente, el microbioma abarca un espectro más amplio que la microbiota. El conocimiento del microbioma se ha ampliado con el uso de técnicas de secuenciación masiva de última generación. Los cultivos microbiológicos se han utilizado para determinar la composición de la microbiota, pero un gran número de los microorganismos de este ecosistema no pueden cultivarse por medios tradicionales y su detección sólo es posible con la secuenciación del ADN (Del Campo-Moreno et al., 2018).

La microbiota humana forma una comunidad microbiana compleja, siendo la más estudiada la microbiota intestinal que mantiene su relación con diversos órganos del cuerpo. La microbiota intestinal tiene un papel clave en la modulación de la inmunidad, pérdida o aumento de peso, homeostasis energética y problemas relacionados con trastornos de obesidad entre otros (Afzaal et al., 2022). La microbiota intestinal se considera la más importante para mantener nuestra salud. Las bacterias intestinales cumplen varias funciones que van desde fermentación de alimentos, protección contra patógenos, estimulación de la respuesta inmune hasta la producción de vitaminas (Hou et al., 2022).

Es importante comprender la estabilidad de la microbiota dentro de un individuo a lo largo del tiempo para predecir estados patológicos y desarrollar terapias que permitan corregir la disbiosis (desequilibrios en la comunidad microbiana). La composición de la microbiota es relativamente estable en individuos adultos sanos a lo largo del tiempo para las bacterias (Caporaso et al., 2011; Costello et al., 2009), virus (Reyes et al., 2010) y eucariotas (Scanlan & Marchesi, 2008).

La microbiota humana se establece luego del nacimiento y se estabiliza durante los primeros 2 a 3 años de vida (Koenig et al., 2011; Scholtens et al., 2012). Durante el desarrollo, la composición microbiana aumenta en diversidad y riqueza y alcanza la mayor complejidad en adultos (Scholtens et al., 2012). Este patrón está marcado por cambios importantes en la taxonomía de la microbiota asociados con el uso de antibióticos y la introducción de alimentos sólidos (Koenig et al., 2011). Cada individuo alcanza una homeostasis que permanece relativamente estable durante la mayor parte de la vida adulta. En las últimas etapas de la vida, la composición de la microbiota vuelve a ser menos diversa (Biagi et al., 2010).

La dieta y los hábitos alimentarios constituyen otro factor importante en el desarrollo de la composición de la microbiota. A edades tempranas, se descubrió que la microbiota de los lactantes amamantados con fórmula artificial difiere significativamente en composición como en diversidad respecto a los amamantados naturalmente, que contienen una microbiota más heterogénea y con mayor diversidad taxonómica (Ottman et al., 2012).

La composición de la microbiota varía de un sitio a otro. También se localiza en otros órganos, además del intestino como la cavidad bucal, los pulmones, la vagina y la piel. La microbiota bucal se considera la segunda comunidad microbiana más grande del ser humano después del intestino (Hou et al., 2022). El Proyecto de Microbioma Humano constituyó dos fases: la primera fase (años 2007 a 2012) fue diseñada para realizar un estudio de las comunidades microbianas de cinco hábitats principales del cuerpo humano (oral, piel, fosas nasales, tracto gastrointestinal y tracto urogenital) y para evaluar si una comunidad microbiana característica se asociaba con un estado de salud específico del hospedero. La segunda fase (años 2013 a 2016) de este programa se diseñó para crear un conjunto de datos integrados de las propiedades biológicas tanto del microbioma como del hospedero a lo largo del tiempo, en una serie de cohortes de enfermedades, como un recurso para la comunidad de investigación más amplia (NIH Human Microbiome Portfolio Analysis Team et al., 2019). Sin embargo, inicialmente en el proyecto del Microbioma Humano el tracto urinario no fue incluido.

A partir del 2012 se obtuvo evidencia de que existe una microbiota asociada al tracto urinario, la cual es única y sustancialmente diferente a las poblaciones en el intestino y en la vagina (Fouts et al., 2012).

1.2 La microbiota urinaria.

Históricamente, la orina se consideraba un “líquido estéril” y los científicos la estudiaban para predecir y confirmar infecciones del tracto urinario (ITU). En 1957, Edward Kass publicó su criterio que consistía en el recuento de bacterias cultivadas de orina fresca: el número de bacterias superior o igual a 10^5 unidades formadoras de colonia por cada mililitro de orina (UFC/mL) era predictivo de una ITU. Esto se basó en los resultados obtenidos de dos estudios de tamaño muestral pequeño y el criterio se continúa aplicando hasta la actualidad (Morand et al., 2019).

Desde 2012 distintas investigaciones aseveran que la orina de la vejiga está colonizada por comunidades bacterianas. El papel del microbioma urinario o urobioma en las enfermedades urológicas ha crecido rápidamente en los últimos cinco años y podría ser un factor clave de susceptibilidad a estas enfermedades como el cáncer de vejiga (Yacouba et al., 2022). Otros trastornos funcionales como la cistitis intersticial, la incontinencia urinaria de urgencia y la prostatitis crónica tienen características de un microbioma alterado con agentes etiológicos o urotipos dominantes específicos en comparación con la orina de individuos sanos. Los conocimientos sobre el impacto del microbioma urinario pueden ayudar a comprender mejor la afección y proporcionar un tratamiento más efectivo (Magistro & Stief, 2019). Sin embargo, como se mencionó previamente, desde hace más de 10 años se ha reconocido la existencia de un microbioma urinario que está compuesto de una comunidad microbiana compleja (Wolfe et al., 2012; Whiteside et al., 2015; Antunes-Lopes et al., 2020; Jones et al., 2021). La detección de secuencias del gen de ARNr 16S bacteriano en muestras de orina de mujeres y el cultivo de microorganismos mediante técnicas

de cultivo cuantitativo expandido de orina (EQUC) en muestras que no presentaban crecimiento de microorganismos por las técnicas de cultivo convencionales apoyaron la existencia de una microbiota urinaria (Hrbacek et al., 2022).

El microbioma de la orina incluye: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* y *Actinobacteria* (Karstens et al., 2016). Actualmente se está describiendo un urobioma que incluye microorganismos cultivables y no cultivables, sin embargo, la mayoría de los estudios en el tracto urinario hasta la fecha se centraron en el urobioma femenino debido a trastornos urológicos que afectan a las mujeres (Schneeweiss et al., 2016; Brubaker & Wolfe, 2017).

Tanto el urobioma masculino como el femenino están dominados por el filo *Firmicutes*, mientras que *Actinobacteria* y *Bacteroidetes* no se encontraron en el urobioma masculino (Nelson et al., 2010; Lewis et al., 2013; Karstens et al., 2016). En general, el urobioma masculino se describe como un entorno menos complejo, que se distingue del urobioma femenino en función de la abundancia relativa de diferentes géneros (Fouts et al., 2012; Cefrnja et al., 2021). *Corynebacterium* fue identificado como el género dominante del urobioma masculino y se encuentra presente principalmente en el microbioma de la piel (Fouts et al., 2012). Otros géneros bacterianos identificados tanto en el urobioma masculino como femenino incluyen *Lactobacillus spp*, *Streptococcus spp* y *Staphylococcus spp* (Gottschick et al., 2017). Los microorganismos presentes en el urobioma masculino son similares a los presentes en el microbioma de la piel, mientras que el urobioma femenino presenta microorganismos en común con el microbioma vaginal (Fouts et al., 2012, Lewis et al., 2013). Los principales componentes del urobioma femenino reportados son *Escherichia coli* (*E. coli*),

Streptococcus spp, *Lactobacillus spp*, *Enterococcus spp*, *Shigella spp*, *Gardnerella spp*, *Prevotella spp* y *Sneathia spp* (Gottschick et al., 2017; Price et al., 2020).

Existen pocos estudios sobre el papel específico de la microbiota urinaria en el mantenimiento de la homeostasis y sus mecanismos subyacentes. La microbiota urinaria podría desempeñar un papel en la modulación de la respuesta inmune, asociación con distintas patologías y tratamiento del cáncer (Jones-Freeman et al., 2021). La incontinencia urinaria y otros síntomas crónicos del tracto urinario se asociaron con la modificación de los componentes microbianos de la orina (Wolfe et al., 2012; Hilt et al., 2014). La microbiota urinaria también puede influir en el cáncer de vejiga: la inmunoterapia intravesical con BCG (una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*) es un tratamiento para el cáncer de vejiga no músculo invasivo. Otras micobacterias como *Mycobacterium indicus pranii* se han estudiado como alternativas terapéuticas (Whiteside et al., 2015).

1.3 Infección del tracto urinario.

1.3.1 Conceptos principales.

Clásicamente, las ITU se definen como la presencia de microorganismos patógenos en el tracto urinario con la aparición de una respuesta inflamatoria y la presencia de síntomas y signos compatibles (Foxman, 2002). Es una infección que afecta los órganos del tracto urinario: riñones, uréteres, vejiga y uretra (Tan & Chlebicki, 2016). El término ITU es amplio y se puede aplicar a cualquier microorganismo uropatógeno (bacteriano, fúngico, viral) que infecta cualquier parte del tracto urinario, desde los riñones hasta la uretra, en ambos sexos (Chai et al., 2024).

Las ITU se clasifican tradicionalmente según su localización anatómica, incluyendo uretritis que afecta la mucosa uretral, cistitis que se limita a la vejiga y pielonefritis cuando la infección asciende hasta los riñones. En varones, también puede presentarse prostatitis. Es importante destacar la existencia del síndrome uretral agudo, una condición caracterizada por síntomas urinarios bajos como disuria, frecuencia y urgencia, que puede presentarse sin bacteriuria significativa y es más común en mujeres. Este síndrome puede estar asociado o no a infecciones de transmisión sexual (ITS). Es fundamental distinguir entre ITU convencionales e ITS, ya que estas últimas requieren un abordaje específico con tratamientos dirigidos (Bonkat et al., 2023).

Las bacterias pueden estar presentes en el tracto urinario sin causar inflamación ni síntomas. Esta afección se denomina bacteriuria asintomática. La bacteriuria asintomática se define por la presencia en la orina de ≥ 100.000 UFC/mL, en ausencia de síntomas de ITU (Mehnert, 2005; Stamm & Hooton, 2000; Nicolle et al., 2005).

Los síntomas de las ITU pueden variar desde irritación en la micción hasta bacteriemia, sepsis y en algunos casos incluso la muerte (Foxman, 2002).

Las mujeres se ven afectadas de forma desproporcionada por las ITU. La corta longitud de la uretra femenina fue considerada un factor de riesgo de ITU (permitiendo el ascenso de microorganismos que colonizan el periné). Se considera que las mujeres son más propensas a estas infecciones debido a los acontecimientos biológicos que ocurren en su vida: ciclos menstruales, embarazos/partos, la actividad sexual y los niveles de estrógeno (Chai et al., 2024). El tracto urinario inferior en los varones está anatómicamente conectado al tracto reproductivo (próstata, epidídimo, testículos), por lo que una ITU puede

involucrar prostatitis y epididimitis y epididimoorquitis. Esto puede ocurrir porque los uropatógenos que ingresan a la vejiga de manera retrógrada a través de la uretra también pueden acceder al tracto reproductivo (Chai et al., 2024).

1.3.2 Métodos diagnósticos de laboratorio.

El diagnóstico de ITU se basa en características clínicas y microbiológicas. El paciente debe tener uno de los siguientes síntomas: fiebre, sensibilidad suprapúbica, dolor lumbar, urgencia urinaria, aumento de la frecuencia urinaria o disuria (Hooton, 2012). La mayoría de las muestras de orina se obtienen mediante la técnica de chorro medio. Esta técnica es simple, económica, no invasiva ni incómoda. En cuanto al transporte de las muestras, debe realizarse dentro de las 2 horas posteriores a la recolección, a menos que las muestras hayan sido refrigeradas a 4°C, donde se pueden conservar hasta 24 horas (Wilson & Gaidó, 2004).

La técnica considerada “gold standard” para el diagnóstico de ITU es el urocultivo estándar (UE) (Stamm et al., 1980; Pezzlo, 2014; Roberts et al., 2011). Esta técnica permite la detección de un número limitado de microorganismos, principalmente bacterias aeróbicas y de rápido crecimiento, como *E. coli*. Sin embargo, con este método no se detectan microorganismos anaeróbicos caracterizados por un crecimiento lento o bacterias con necesidades complejas de nutrientes (Pérez-Carrasco et al., 2021). Para considerarse una ITU, los pacientes deben tener un urocultivo con no más de 2 especies distintas de microorganismos y con un recuento $\geq 10^5$ UFC/mL si la muestra fue recolectada por chorro medio (Hooton, 2012). Sin embargo, varios estudios han establecido que más de un tercio de los pacientes, mayormente mujeres sintomáticas, tiene

valores de UFC por debajo de los niveles mencionados y presentan ITU (Kunin et al., 1993; Stamm et al., 1982; Komaroff, 1986; Hooton et al., 2000).

Los urocultivos de rutina consisten en sembrar 10 µL de la muestra con asas calibradas, brindando información sobre el número de UFC/mL, colonias aisladas para identificación y pruebas de susceptibilidad. Los medios de cultivo que se utilizan en la mayoría de los laboratorios de microbiología clínica son agar sangre (AS), que permite el crecimiento de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y agar Mac Conkey Lactosa (AMc), medio selectivo y diferencial para Gram-negativas. Los urocultivos deben incubarse durante 24 horas a una temperatura de 35-37 °C en aerobiosis antes de su interpretación (Wilson & Gaidó, 2004).

Como complemento al UE, en 2014 Hilt y colaboradores estudiaron la microbiota urinaria de pacientes con vejiga hiperactiva con la técnica de EQUIC (Hilt et al., 2014). Este protocolo consiste en sembrar una muestra de orina en un grupo de medios de cultivo que incluyen placas de AS, agar chocolate (ACH) y ácido nalidíxico y colistina (CNA), que luego se incuban en condiciones aeróbicas y anaeróbicas a 35°C durante 48 horas (Price et al., 2020). En el estudio de Hilt, mediante EQUIC se detectaron 35 géneros bacterianos y 85 especies bacterianas diferentes, la mayoría de las cuales no se observaron por UE. La inoculación de un volumen mayor (100 µL) combinado con incubaciones prolongadas en varias atmósferas durante 48 horas permitió recuperar bacterias en bajas concentraciones (menos de 10^3 UFC/mL). Este método evidenció la presencia de bacterias en el 80% de las muestras de orina de pacientes sin ITU mientras que se recupera el 8% con los métodos de rutina (Hilt et al., 2014).

Los géneros bacterianos más comunes detectados con EQUUC en la microbiota urinaria fueron *Lactobacillus* (15% de población de estudio), *Corynebacterium* (14,2%), *Streptococcus* (11,9%), *Actinomyces* (6,9%) y *Staphylococcus* (6,9%). Los autores concluyeron que el EQUUC era más sensible que el UE para detectar bacterias uropatógenas y no uropatógenas en la orina confirmando la presencia de una microbiota urinaria residente en mujeres (Hilt et al., 2014).

Esta técnica de EQUUC es más sensible que el UE en la detección de diversos uropatógenos. Sin embargo, al igual que la técnica de rutina, el crecimiento de uropatógenos en el EQUUC no significa que sean clínicamente relevantes ni generen síntomas urinarios (Chai et al., 2024).

Otras técnicas no dependientes de cultivo disponibles son las de biología molecular, como PCR múltiplex (mPCR) dirigida a bacterias determinadas que causan ITU (Wojno et al., 2020). Por otro lado, se pueden utilizar cebadores universales para amplificar todos los genes ARNr 16S de una muestra de orina, secuenciar estos amplicones y comparar con una base de datos para identificar los géneros bacterianos. La secuenciación del gen ARNr 16S al igual que EQUUC mejoran la posibilidad de encontrar más uropatógenos en relación a los métodos específicos de mPCR y UE (Chai et al., 2024).

En estudios realizados en mujeres asintomáticas (n=224) se aplicó EQUUC y secuenciación del gen ARNr 16S y encontraron que los principales componentes de la microbiota urinaria eran miembros de los géneros *Lactobacillus spp*, *Streptococcus spp*, *Gardnerella spp* y *E. coli* (Price et al., 2020).

Otro estudio en mujeres asintomáticas (n=59) comparó las técnicas EQUUC y secuenciación del gen ARNr 16S, evidenciado que esta última es una técnica de mayor sensibilidad en la detección de bacterias. Mientras que mediante

secuenciación se detectaron *Streptococcaceae spp*, *Staphylococcaceae spp*, *Pseudomonadaceae spp*, *Lactobacillaceae spp* y *Enterobacteriaceae spp*, por la técnica de EQUUC se observaron los géneros *Enterococcaceae spp*, *Peptoniphilaceae spp*, *Morganellaceae spp*, *Corynebacteriaceae spp* y *Leuconostocaceae spp*. Presentando un 15% de concordancia entre ambas técnicas, por lo que son técnicas complementarias para informar los resultados obtenidos (Vaughan et al., 2022).

Recientemente, la espectrometría de masas MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) revolucionó el campo de la microbiología (Clark et al., 2013; Singhal et al., 2015). Es una técnica analítica en la que compuestos químicos se ionizan en moléculas cargadas y se mide la relación entre su masa y su carga (m/z). Los péptidos se convierten en iones mediante la adición o pérdida de uno o más protones (Singhal et al., 2015).

La muestra para el análisis por MALDI se prepara recubriendo con una solución de un compuesto orgánico absorbente de energía llamado matriz. La muestra dentro de la matriz se ioniza de manera automática con un rayo láser. La desorción e ionización con el rayo láser genera iones protonados simples a partir de los analitos en la muestra. Luego, los iones protonados se aceleran a un potencial fijo, donde se separan entre sí en función de su relación masa-carga (m/z). Luego, los analitos cargados se detectan y se miden utilizando diferentes tipos de analizadores de masas, como analizadores de trampa de iones, analizadores de tiempo de vuelo (TOF), etc. Para aplicaciones microbiológicas, se utilizan principalmente analizadores de masas TOF. En base a la información de TOF, se genera un espectro característico llamado huella de masa de péptidos (PMF) para los analitos en la muestra (Singhal et al., 2015).

La identificación de microorganismos mediante MALDI-TOF se realiza comparando las PMF de un organismo desconocido con las PMF contenidas en la base de datos o haciendo coincidir las masas de biomarcadores de un organismo desconocido con la base de datos del proteoma (Singhal et al., 2015). Por lo tanto, la identidad de un microorganismo se puede establecer hasta el género y, en muchos casos, hasta el nivel de especie y cepa (Fagerquist et al., 2010). Esta técnica se usa ampliamente en la identificación microbiana porque es simple y puede emplearse convenientemente en un laboratorio de diagnóstico microbiológico, con la ayuda de la disponibilidad de bibliotecas comerciales de PMF de organismos (Singhal et al., 2015).

1.3.3 Epidemiología.

Entre las infecciones más frecuentes del ser humano, la ITU constituye un importante problema de salud que afecta a millones de personas cada año. Es la segunda causa de infección más frecuente en humanos, superada por las infecciones del tracto respiratorio. Alrededor de 150 millones de personas por año sufren esta patología (Stamm & Norrby, 2001).

La incidencia de las ITU es elevada en todo el mundo. Se estima que el 50% de las mujeres y el 12% de los varones experimentan al menos un episodio de ITU en su vida. A su vez, un cuarto del 50% de mujeres con esta afección tendrán recurrencia dentro de los próximos 6 a 12 meses. En pediátricos la recurrencia es del 20-40% en los 12 meses siguientes al primer episodio (Koljalg et al., 2009; Foxman, 2003).

1.3.4 Agentes etiológicos.

Las ITU son causadas por una amplia gama de patógenos: bacterias Gram negativas y Gram positivas y hongos (Flores-Mireles et al., 2015). El agente etiológico más frecuente (80% de los casos) es *E. coli* uropatogénico (UPEC) (figura 1) (Flores-Mireles et al., 2015, Robino et al., 2014a) seguido por *Klebsiella pneumoniae* (6%), *Staphylococcus saprophyticus* (6%), *Proteus mirabilis* (4%), entre otros (Seija et al., 2010). *E. coli* es el patógeno predominante en todos los rangos etarios (Alonso et al., 2001). Para las ITU complicadas, si bien *E. coli* continúa siendo el agente predominante, también causan ITU: *Enterococcus* spp., *K. pneumoniae*, *Candida* spp., *S. aureus*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* y *Streptococcus* del grupo B (Flores-Mireles et al., 2015).

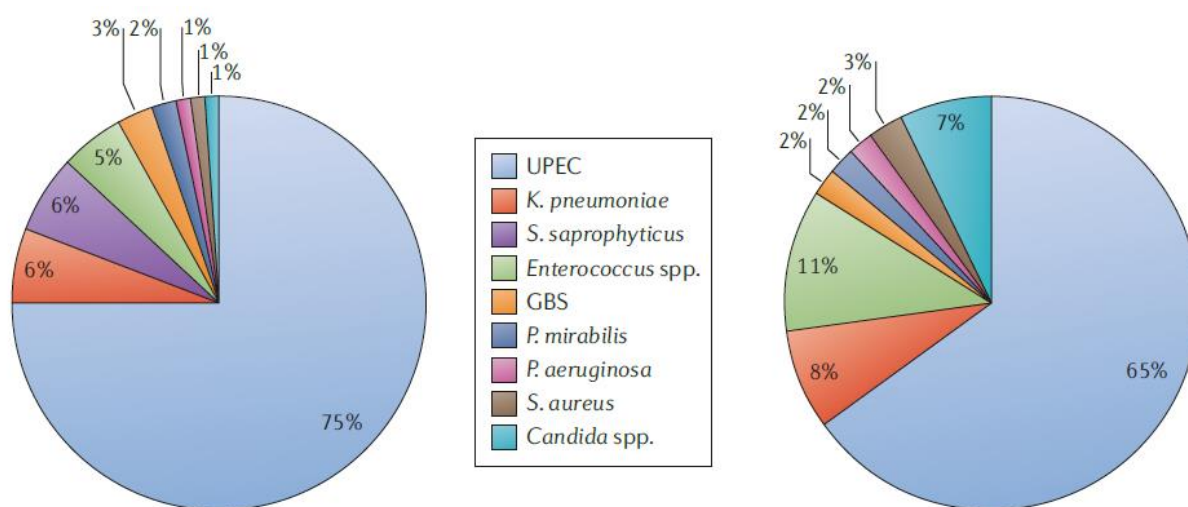


Figura 1. Epidemiología de las ITU. Principales agentes etiológicos causantes de ITU no complicadas (izq) e ITU complicadas (der). Tomada de Flores-Mireles et al., 2015.

1.3.5 Patogenia.

El avance de las infecciones urinarias está estrechamente relacionado con la eficacia de una serie de estrategias que los uropatógenos han desarrollado para

adherirse e invadir los tejidos del hospedero. A menudo, la infección no parece particularmente grave, especialmente en las primeras etapas, pero puede empeorar significativamente en presencia de factores que la compliquen (Mancuso et al., 2023).

El mecanismo clásico de patogénesis del tracto urinario (figura 2) establecía que los uropatógenos del intestino contaminan el área periuretral (paso 1) y pueden colonizar la uretra. La migración posterior a la vejiga (paso 2) y la expresión de pili y adhesinas dan como resultado la colonización e invasión de las células “paraguas” superficiales (paso 3). Las respuestas inflamatorias del hospedero, incluida la infiltración de neutrófilos (paso 4), comienzan a eliminar las bacterias extracelulares. Algunas bacterias evaden el sistema inmunológico mediante cambios morfológicos que resultan en resistencia a los neutrófilos y estas bacterias se multiplican (paso 5) y forman biofilms (paso 6). Estas bacterias producen toxinas y proteasas que inducen daño a las células (paso 7), liberando nutrientes esenciales que promueven la supervivencia bacteriana y el ascenso a los riñones (paso 8). La colonización del riñón (paso 9) da como resultado la producción de toxinas bacterianas y daño al tejido del hospedero (paso 10). Este mecanismo de patogenia es el más frecuente, y es llamado por vía ascendente. Otra forma de patogenia es la vía hematógena. Si no se tratan, las ITU pueden eventualmente progresar a bacteriemia si el patógeno cruza la barrera epitelial tubular en los riñones (paso 11) (Flores-Mireles et al., 2015).

Los macrófagos y los mastocitos desempeñan un papel clave en la regulación inmune del tracto urinario, coordinando el reclutamiento y el inicio de respuestas de neutrófilos que conducen a la eliminación de bacterias en la vejiga. Además, estas células son fundamentales para evitar que una respuesta excesiva de

neutrófilos cause daños al tejido de la vejiga y predisponga a este órgano a una infección persistente (Mancuso et al., 2023).

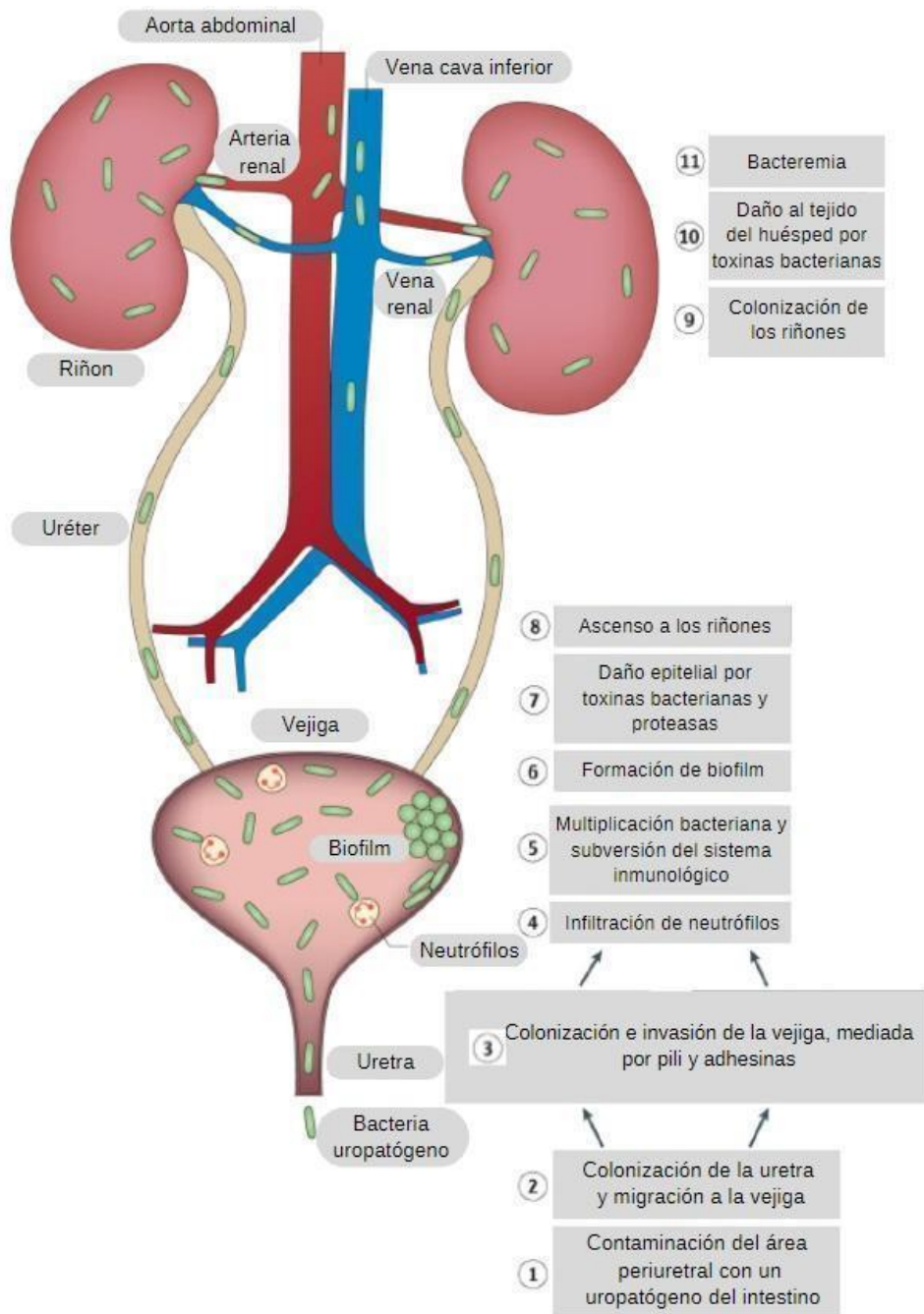


Figura 2. Patogenia de las infecciones del tracto urinario. Tomada de Flores-Mireles et al., 2015.

1.4 Comunidades bacterianas intracelulares.

Las comunidades bacterianas intracelulares (CBI) son estructuras similares a los biofilms con ciclos particulares de desarrollo (Anderson et al., 2003; Mulvey et al., 2001). Rosen y colaboradores describieron por primera vez la presencia de CBI en células exfoliadas en orinas de mujeres con cistitis (Rosen et al., 2007). Las CBI (figura 3) se forman debido a la interacción del patógeno con receptores presentes en la superficie celular que conducen a una reordenación del citoesqueleto de actina, lo que permite la internalización del patógeno en una vacuola endocítica de donde posteriormente son liberados para poder acceder al citosol donde se replican (Barrios-Villa et al., 2022).

Las CBI son importantes porque se han asociado con evasión inmune, resistencia a los antimicrobianos, persistencia en el tracto urinario y recurrencia de infecciones urinarias. Además, se han asociado con resultados falsos negativos de urocultivo, lo que complica el diagnóstico y tratamiento oportuno (Barrios-Villa et al., 2022).

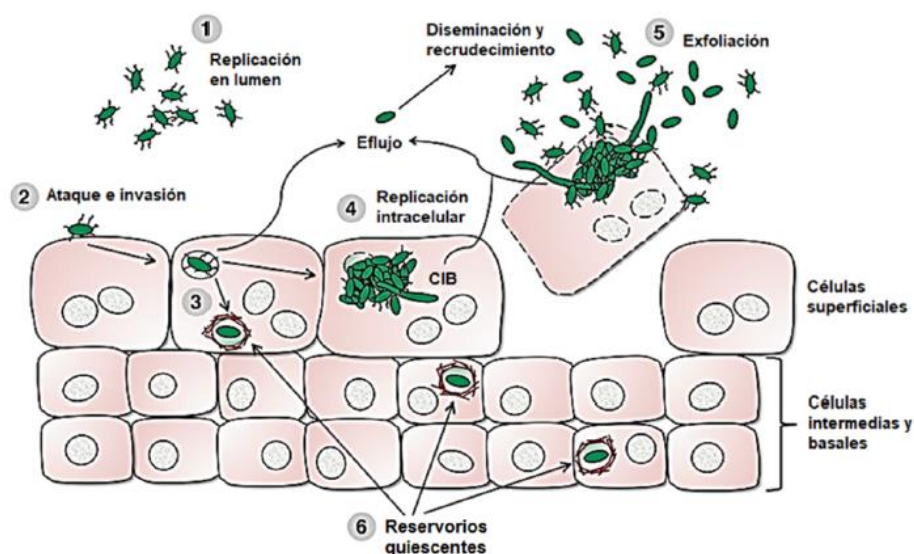


Figura 3. Proceso de formación de comunidades bacterianas intracelulares y los eventos que promueven el establecimiento y la recurrencia de la infección del tracto urinario. Tomada de Barber et. al., 2013.

Estas comunidades se encuentran protegidas del sistema inmune del hospedero y pueden resistir a la acción de los antibióticos que no presentan buena concentración intracelular. UPEC puede causar infecciones persistentes invadiendo células intermedias, formando reservorios intracelulares quiescentes (QIR). Este tipo de bacterias no se replican, sin embargo, son capaces de sobrevivir por meses incluso después de que el hospedero se encuentre en tratamiento con antibióticos. Este tipo de reservorios son una clave importante en el desarrollo de ITU recurrentes y cuadros de cistitis crónica (Sarah & Deborah, 2013).

En la Unidad Académica de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene y en el Laboratorio de Biofilms del Departamento de Microbiología del IIBCE se ha detectado mediante microscopía láser confocal (MLC) la presencia de CBI de

UPEC en muestras de orina de pediátricos con ITU, siendo la primera vez que se describe éste fenómeno a nivel mundial en ésta población. De 133 muestras de orina de niñas y niños con ITU, en 36,8% se detectó la presencia de bacterias intracelulares ya sea de forma individual o formando CBI. La presencia de estas bacterias se encontró significativamente en individuos que habían presentado episodios de ITU previa, en ausencia de alteraciones anatómicas o funcionales del tracto urinario, lo que sugiere que la presencia de bacterias intracelulares podría ser una causa de ITU persistente o recurrente (Robino 2014b; Robino 2013).

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Se plantea como hipótesis identificar la microbiota que habita en el tracto urinario de personas sanas y sintomáticas de ITU, los microorganismos cultivables y los intracelulares así como evaluar una técnica alternativa al urocultivo tradicional como es el urocultivo cuantitativo expandido para obtener mayor cantidad y riqueza de especies bacterianas en la población de estudio.

3. OBJETIVOS

El presente trabajo tiene como objetivo general conocer la lista de especies bacterianas cultivables asociadas al tracto urinario en personas sanas y en pacientes con síntomas urinarios y evaluar e identificar las bacterias intracelulares en las células epiteliales de la vejiga.

Los objetivos específicos son:

- I) Identificar la riqueza de la microbiota urinaria con técnicas dependientes de cultivo en personas sanas y en pacientes con síntomas sospechosos de ITU y comparar si existen diferencias entre ambas poblaciones, así como también según edad y sexo.
- II) Implementar técnicas alternativas de cultivo y compararlas con el urocultivo estándar.
- III) Evaluar la presencia de bacterias intracelulares en las células de la vejiga en personas asintomáticas y en pacientes con síntomas sospechosos de ITU, como parte de la microbiota.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Población de estudio.

Se realizó un estudio descriptivo y experimental en muestras de orina de pacientes entre los años 2021 y 2023. Se incluyeron personas de ambos sexos y de todas las edades, que luego para su análisis fueron divididas en población pediátrica (menores de 15 años) y adultos.

Asimismo, la población de estudio fue dividida en 2 grupos: un grupo de voluntarios “sanos” o asintomáticos y otro grupo de personas con síntomas sospechosos de ITU o sintomáticos. Los criterios de exclusión fueron: la presencia de cateterismo vesical, aquellas personas que requirieron estudios instrumentales del tracto urinario en el último mes a la toma de la muestra y

pacientes que recibieron tratamiento antibiótico en los 3 meses previos al muestreo.

Los pacientes del grupo de sintomáticos fueron asistidos en el Servicio de Urología del Hospital Maciel y en el Centro Hospitalario Pereira Rossell.

Este estudio fue aprobado por los comité de ética humana del IIBCE y la Facultad de Medicina. Se solicitó consentimiento informado a todos los individuos.

Se incluyeron 141 personas (una muestra de orina por persona), siendo 50 individuos pediátricos (35,5 %) y 91 adultos (64,5%). Los pediátricos incluyeron 31 niñas y 19 varones y el grupo de los adultos, 46 mujeres y 45 varones.

A su vez, en el grupo de la población pediátrica, 25 presentaron síntomas de ITU (21 niñas y 4 varones) y 25 asintomáticos (10 niñas y 15 varones). En el grupo de adultos, 44 presentaron síntomas (24 mujeres y 20 varones) y 47 asintomáticos (22 mujeres y 25 varones). Esto completa un total de 69/141 individuos sintomáticos y 72/141 asintomáticos (Figura 4).

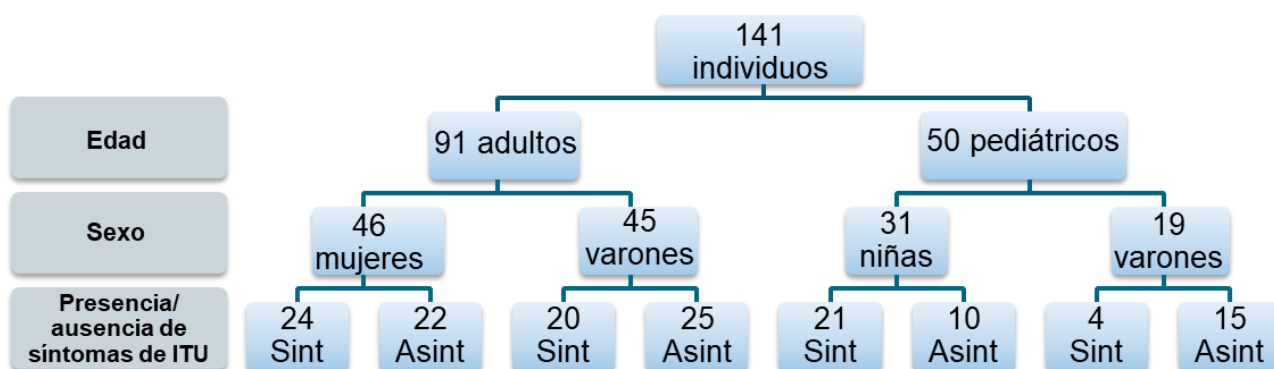


Figura 4. Esquema de la población de estudio. Sint: sintomáticos; Asint: asintomáticos.

4.2 Muestreo de orina.

A los sujetos de estudio se les solicitó la muestra de orina por la técnica de chorro medio o al acecho en los niños sin control de esfínteres. Se les explicó cómo realizar la toma de muestra. Para la población pediátrica, se les explicó a los padres y se les solicitó autorización. Las muestras fueron conservadas a 4°C hasta su procesamiento (menor a 24 hs) en la Unidad Académica de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene. De cada paciente se obtuvo una muestra de orina y se le asignó un número para mantener la confidencialidad de sus datos personales. Además, para cada individuo se registró: la fecha de toma de la muestra, el nombre completo, la edad, el sexo, síntomas presentes al momento de la consulta y el contacto personal.

4.3 Aislamiento de los microorganismos en las muestras de orina por las técnicas de cultivo UE y EQUC.

En el presente trabajo se realizó UE para la identificación y cuantificación de microorganismos cultivables presentes en las muestras de orina recolectadas por técnica de chorro medio. Y se realizó EQUC que según los antecedentes permite una mayor recuperación de microorganismos que UE (Hilt et al., 2014). Se consideró urocultivo positivo al observar crecimiento de colonias, independientemente del recuento.

Para UE se sembraron 10 µL de orina en medios de AS y AMc, y se incubaron en aerofilia a 37°C por 24 hs.

Para EQUC se sembraron 100 µL de orina en AS y AMc en aerofilia (condición A), 10 µL y 100 µL de orina en AS y ACh en una atmósfera 5% CO₂ (condición B) y 10 µL y 100 µL de orina en AS y Agar Man Rogose Sharpe (MRS) en

condiciones de microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂). El medio ACh es un medio de cultivo enriquecido que favorece el crecimiento de microorganismos nutricionalmente exigentes, como *Haemophilus influenzae* y *Neisseria spp*. El medio MRS es un medio selectivo diseñado principalmente para el aislamiento y cultivo de bacterias ácido lácticas, como *Lactobacillus spp*, *Pediococcus spp*, *Leuconostoc spp* y algunas especies de *Streptococcus spp*. En las tres condiciones de EQUQ se incubaron las placas a 37°C por 48 hs (figura 5).

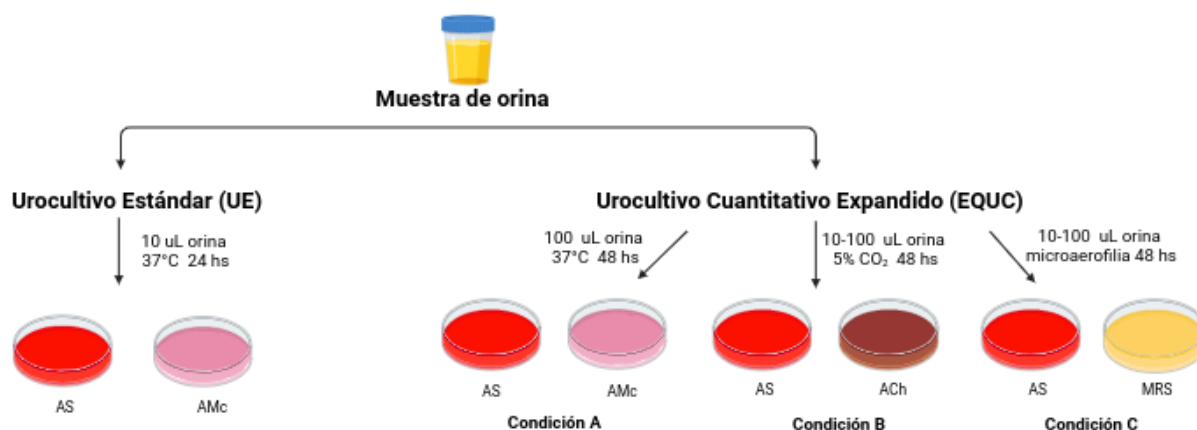


Figura 5. Esquema de procesamiento de las muestras de orina. Técnicas dependientes de cultivo: UE (izq) y EQUQ (der); AS: Agar Sangre, AMc: Agar MacConkey, ACh: Agar Chocolate y MRS: Agar Man Rogose Sharpe.

De cada condición de cultivo se seleccionaron colonias de distinta morfología que se reaclaron en las mismas condiciones para obtener un cultivo puro. Posteriormente, estas cepas se criopreservaron en condiciones de esterilidad tomando una ansada de las colonias aisladas, se sumergieron inmediatamente en criotubos con glicerol al 20% en caldo Luria Bertani (LB) y se conservaron a -80°C para efectuar luego la identificación por MALDI-TOF.

4.4 Técnica de recuperación de las bacterias intracelulares por cultivo mediante ensayo de protección con gentamicina.

Se realizó la centrifugación de 14 mL de cada muestra de orina a 1000 rpm a temperatura ambiente (TA) por 5 minutos. Luego, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 mL de PBS 1x. Se sembraron 50 µL de la suspensión en una placa de AS como control de crecimiento de microorganismos extracelulares. Se adicionó a la suspensión del pellet restante un volumen de gentamicina para alcanzar una concentración final de 100 µg/mL, que permite eliminar las bacterias extracelulares y se incubó a 37°C por 2 hs. Posterior a las 2 hs, se sembraron 50 µL de la suspensión en la misma placa de AS como control de ausencia de crecimiento de bacterias extracelulares. Se centrifugó nuevamente la suspensión a 1000 rpm, 5 minutos, TA. Se resuspendió el pellet en 10 mL de PBS 1x con el fin de eliminar la gentamicina. Se centrifugó a 1000 rpm, 5 minutos, TA, descartando luego el sobrenadante hasta obtener un volumen final de 1 mL. Las células en el pellet fueron lisadas con tritón 0,1% y fue incubado a 37°C por 15 minutos. Se sembraron 50 µL en la misma placa de AS, que se incubó a 37°C por 24 hs. El crecimiento de colonias en la última condición corresponde a las bacterias intracelulares. Las colonias aisladas fueron identificadas por MALDI-TOF.

4.5 Identificación de los microorganismos aislados de UE, EQUC y de los cultivos de intracelulares por espectrometría de masas MALDI-TOF.

Las colonias reaisladas de cada muestra de orina, que se encontraban a -80°C, fueron sembradas e incubadas en las mismas condiciones que en los cultivos iniciales. Los cultivos puros se enviaron al Servicio del Instituto de Higiene y a la

repartición de Microbiología del Departamento de Laboratorio Clínico del Hospital de Clínicas para efectuar la técnica de MALDI-TOF (Bruker Daltonik microflex).

Para ello se depositó una colonia en uno de los pocillos de la placa metálica del equipo y se cubrió con 1 µL de la matriz del equipo. Luego se introdujo la placa para obtener mediante un software asociado la identificación de los microorganismos en pocos minutos.

4.6 Evaluación de las bacterias intracelulares por microscopía.

4.6.1 Preparación de las muestras de orina para su visualización microscópica.

Se citocentrifugaron sobre láminas de vidrio 1000 µL de orina durante 6 minutos a 2000 rpm (se prepararon 2 láminas por muestra de orina, 1 para inmunofluorescencia y 1 para tinción con May-Grünwald-Giemsa -MGG-). Los frotis para inmunofluorescencia fueron fijados con 200 µL de paraformaldehído 4,5% por 30 minutos y para la tinción con MGG fueron fijados con calor. Las láminas se guardaron a 4°C hasta el día de la tinción.

4.6.2 Tinción de May-Grünwald-Giemsa y observación de las células epiteliales en orina por microscopía óptica.

En una primera instancia, a manera de evaluar la presencia de células epiteliales de vejiga descamadas en orina, se realizó la tinción de MGG.

Se cubrieron las láminas con May-Grünwald durante 3 minutos. Se lavaron y se agregó Giemsa durante 5 minutos. Se lavaron nuevamente con agua destilada, para luego observar el preparado en el microscopio óptico NIKON YS100 con el objetivo de inmersión 100X. Se evaluó la presencia de células epiteliales en cada

muestra. En caso de visualizar estas células se procedió a la tinción con fluoróforos para su evaluación mediante MLC.

4.6.3 Tinción de inmunofluorescencia.

Las muestras en los portaobjetos se tiñeron con anticuerpos primarios de cabra anti-urolaquina III (UPIII, Santa Cruz Biotechnology) 1/50 seguido de una incubación con el anticuerpo secundario de burro anti-inmunoglobulina G de cabra Alexa Flúor 568 durante 15 minutos. Después de lavar con PBS 1x, se realizó una permeabilización celular con 0,3% de Triton X-100 durante 15 minutos. Luego, los portaobjetos se incubaron con 5,0 µg/mL de marcador de membrana conjugado con Alexa Flúor 488 (WGA: wheat germ aglutining, Molecular Probes) y Hoescht 33342 (10 µg/mL) durante 30 minutos. Una vez finalizada la incubación, los portaobjetos se lavaron con PBS 1x y luego se montaron con 10 µL de buffer de montaje citifluor y se sellaron con un cubreobjetos. Los preparados se conservaron en oscuridad a 4°C hasta su evaluación en MLC. En la tabla 1 se visualiza la lista de moléculas acopladas a fluoróforos.

Tabla 1. Moléculas acopladas a fluoróforos para la tinción de fluorescencia y análisis por MLC.

Moléculas	Blanco	$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ (nm)
WGA conjugado Alexa Flúor 488	N-acetilglucosamina y ácido N-acetilneuramínico de membranas celulares	495/519
Hoescht 33342	ADN/núcleos	350/470
Anti-UIII de cabra	Urolaquina III	
Anti-IgG de cabra en burro (Alexa Flúor 568)	IgG de cabra	579/603

4.6.4 Microscopía láser confocal y adquisición de imágenes.

La adquisición de imágenes fue realizada en la Plataforma de Microscopía Confocal y Epifluorescencia del IIBCE utilizando el microscopio de láser confocal LSM ZEISS 800, con el software ZEN Blue 2.3 con módulos para AiryScan Processing, TileScan y Experiment Designer. La visualización se llevó a cabo con un aumento de 100X (AN 1.4), con longitudes de onda de excitación/emisión: 350/460, 488/520, 543/565. El paso de adquisición de imágenes fue de 0,3 μm en el eje z y de 1024 x 1024 píxeles en los planos xy. Las imágenes 3D se reconstruyeron utilizando el software ZEN (Zeiss) y Volocity (Perkin Elmer).

4.7 Análisis estadístico de los resultados obtenidos.

El análisis estadístico se realizó con el software SPSS 26.0 (IBM SPSS Statistics Inc, Chicago, Illinois). Se aplicó la prueba de chi-cuadrado o Fisher, que permite analizar si existe una relación significativa entre dos variables nominales e independientes y se calculó el odds ratio (OR) para entender la magnitud y dirección de esa asociación con un intervalo de confianza (IC) de 95%. Para la comparación de las técnicas de UE y EQUC, se utilizó el test de McNemar, que permite analizar datos pareados en variables categóricas dicotómicas. Se compararon ambas metodologías en la misma cantidad de individuos, evaluando si las discordancias entre las técnicas eran significativas. En ambas pruebas (chi-cuadrado y McNemar) se consideró estadísticamente significativo un valor de $p \leq 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1 Identificación de los microorganismos de la microbiota urinaria.

Se identificaron mediante MALDI-TOF 43 géneros bacterianos y 66 especies bacterianas distintas en todas las muestras de orina de la población. Se obtuvieron las frecuencias de los microorganismos en el 100% de los aislamientos identificados en ambas técnicas de urocultivo UE y EQU.

5.1.1. Frecuencia de los microorganismos identificados en el total de las muestras estudiadas.

Las especies más frecuentemente encontradas fueron: en 56/141 individuos *Staphylococcus spp* (38%), 49/141 *E.coli* (35%), 31/141 *E. faecalis* (22%), 17/141 *Proteus spp* (12%), 16/141 *Streptococcus spp* (11%), 10/141 *Klebsiella spp* (7%), 6/141 *Corynebacterium spp* (4%), 2/141 *S. maltophilia* (1%), 2/141 *Morganella morganii* (1%), 2/141 *E. cloacae* (1%), 2/141 *Weeksella virosa* (1%), 2/141 *Citrobacter Koseri* (1%), 2/141 *Pseudoglutamicibacter cumminsii* (1%) y 2/141 *Raoultella ornithinolytica* (1%).

Otros microorganismos encontrados de manera aislada fueron: *Oligella urethralis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Facklamia hominis*, *Peptonifillus harei*, *Dermabacter hominis*, *Campylobacter spp*, *Fusobacterium spp*, *Veillonella spp*. En 21 individuos no hubo crecimiento de microorganismos (sin crecimiento: SC, 15%) (figura 6).

En la condición C de EQU, que favorece el crecimiento de bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus spp*, se observó desarrollo en 120 muestras (76 adultos: 44 mujeres -22 asintomáticas y 22 sintomáticas- y 32 varones -18

asintomáticos y 14 sintomáticos-; y 44 pediátricos: 28 niñas -9 asintomáticas y 19 sintomáticas- y 16 varones -13 asintomáticos y 3 sintomáticos). No fue posible completar la identificación de los microorganismos aislados en esta condición debido a la baja recuperación de los mismos criopreservados a -80°C y la base de datos de MALDI-TOF puede no contener perfiles espectrales para todas las especies de *Lactobacillus spp.*

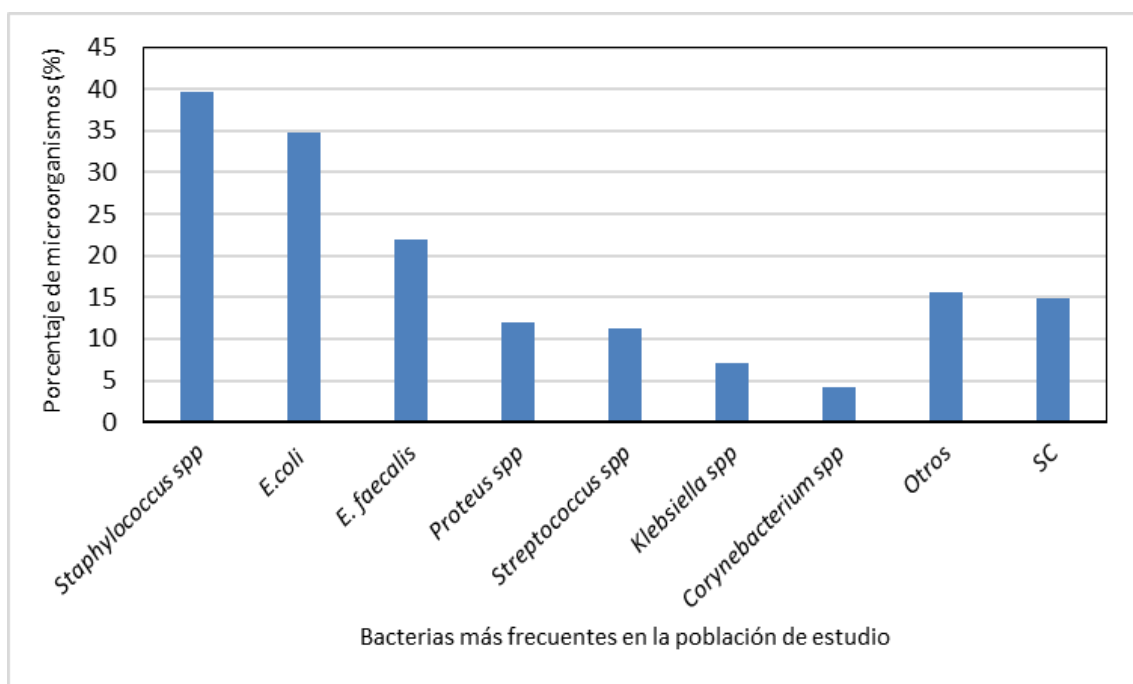


Figura 6. Frecuencia de los microorganismos aislados en muestras de orina de la población de estudio. Se incluyen resultados de bacterias que co-existen en un mismo individuo. SC: sin crecimiento de microorganismos.

Dentro del género *Staphylococcus spp* se identificaron 12 especies. Las especies más frecuentes fueron *S. haemolyticus* (34/56 individuos) y *S. epidermidis* (23/56 individuos). En 38 individuos se identificó una sola especie de este género: 20 presentaban *S. haemolyticus*, 10 *S. epidermidis*, 2 *S.*

lugdunensis y *S. capitis*, 1 *S. saprophyticus*, *S. simulans*, *S. hominis* y *S. pettenkoferi*. Las otras 4 especies (*S. condimenti*, *S. warneri*, *S. cohnii* sp *urealyticus* y *S. caprae*) se encontraron colonizando junto a otras especies de *Staphylococcus spp* en un mismo individuo. En varios individuos se encontró la coexistencia de 2, 3 y 4 especies de este género.

En el género *Streptococcus spp* las especies más frecuentes fueron *S. anginosus* (7/16 pacientes) y *S. agalactiae* (3/16 pacientes). Otras especies de éste género detectadas fueron: *S. mitis*, *S. sanguis*, *S. constellatus*, *S. oralis* y *S. gallolyticus*. En el género *Proteus spp* la principal especie fue *P. mirabilis* (15/17 pacientes) y también se identificaron 2 casos con *P. vulgaris*. En *Klebsiella spp*, *K. pneumoniae* fue la especie más frecuente (8/10 pacientes), seguida de *K. variicola*.

5.1.2. Frecuencia de los microorganismos encontrados en la orina según la presencia/ausencia de síntomas de ITU.

Los microorganismos detectados con mayor frecuencia en la población de individuos asintomáticos fueron: *Staphylococcus spp* (46/72, 64%), *E. faecalis* (17/72, 23%), *E. coli* (13/72, 18%) y *Streptococcus spp* (10/72, 14%).

El género *Staphylococcus spp* se asoció estadísticamente con la población de individuos asintomáticos (46/72, $p=1,89e^{-9}$), presentando un OR de 10,44 con un IC de 95 % (4,5-23,8) (figura 7).

En los pacientes sintomáticos se observó mayoritariamente *E. coli* (36/69, 52%), *E. faecalis* (14/69, 20%), *Staphylococcus spp* (11/69, 16%) y *Klebsiella spp* (9/69, 13%). El desarrollo de *E.coli* (36/69, $p=2,2e^{-5}$, OR 4,95, IC de 95% -2,30-10,63-)

y *Klebsiella spp* (9/69, $p=0,008$) se asoció estadísticamente con la presencia de síntomas de ITU.

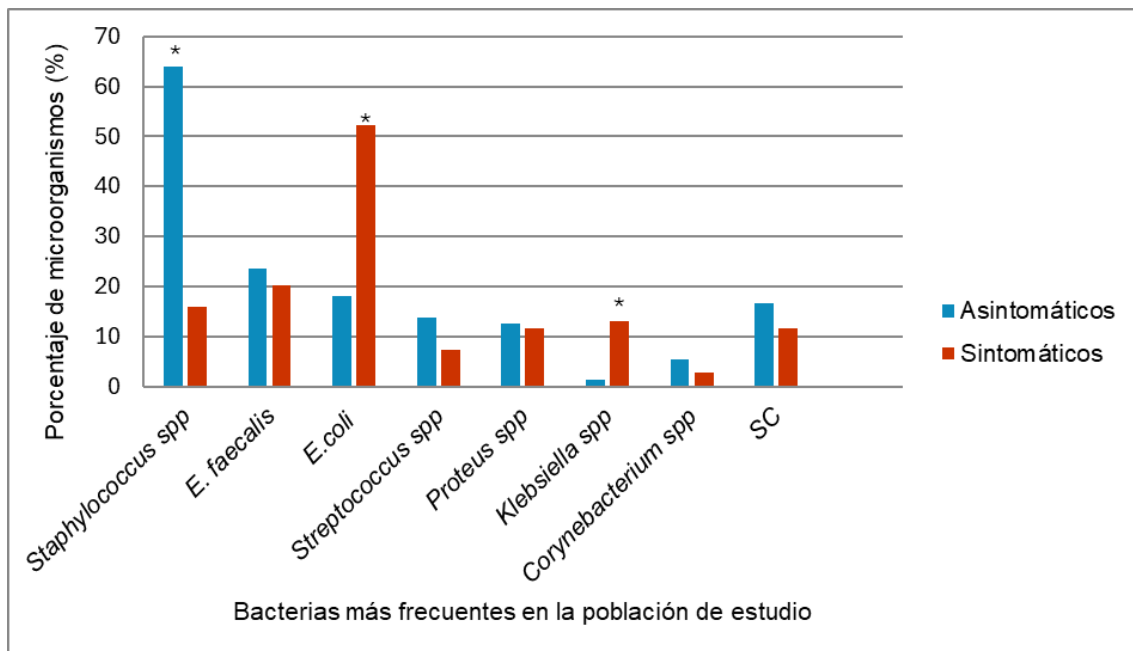


Figura 7. Frecuencia de los microorganismos aislados en la población de individuos asintomáticos y sintomáticos. Se incluyen resultados de bacterias que co-existen en un mismo individuo. SC: sin crecimiento de microorganismos. (*) indica diferencias significativas entre muestras de orina de individuos asintomáticos y sintomáticos, $p \leq 0.05$.

La distribución de los distintos géneros bacterianos en la población de estudio de acuerdo a la presencia y ausencia de síntomas de ITU se muestra en la figura 8. En los pacientes sintomáticos se identificaron desde 1 hasta 5 especies bacterianas por individuo, distribuidos de la siguiente manera: 38 individuos presentaron 1, 42 individuos 2, 19 individuos 3, 7 individuos 4 y 2 individuos 5. Como puede observarse en esta población predominan entre 1 y 2 especies bacterianas por individuo, siendo *E.coli* la más frecuente (Ver anexo 2).

En la población de asintomáticos el número de especies detectadas por individuo fue entre 1 a 6, distribuidos de la siguiente manera: 23 individuos presentaron 1, 24 individuos 2, 24 individuos 3, 22 individuos 4, 9 individuos 5 y 6 individuos 6. Por lo tanto, en estos individuos se observó mayor cantidad y riqueza de bacterias, con mayor frecuencia de *S. haemolyticus* y *S. epidermidis* además de *E. coli*.

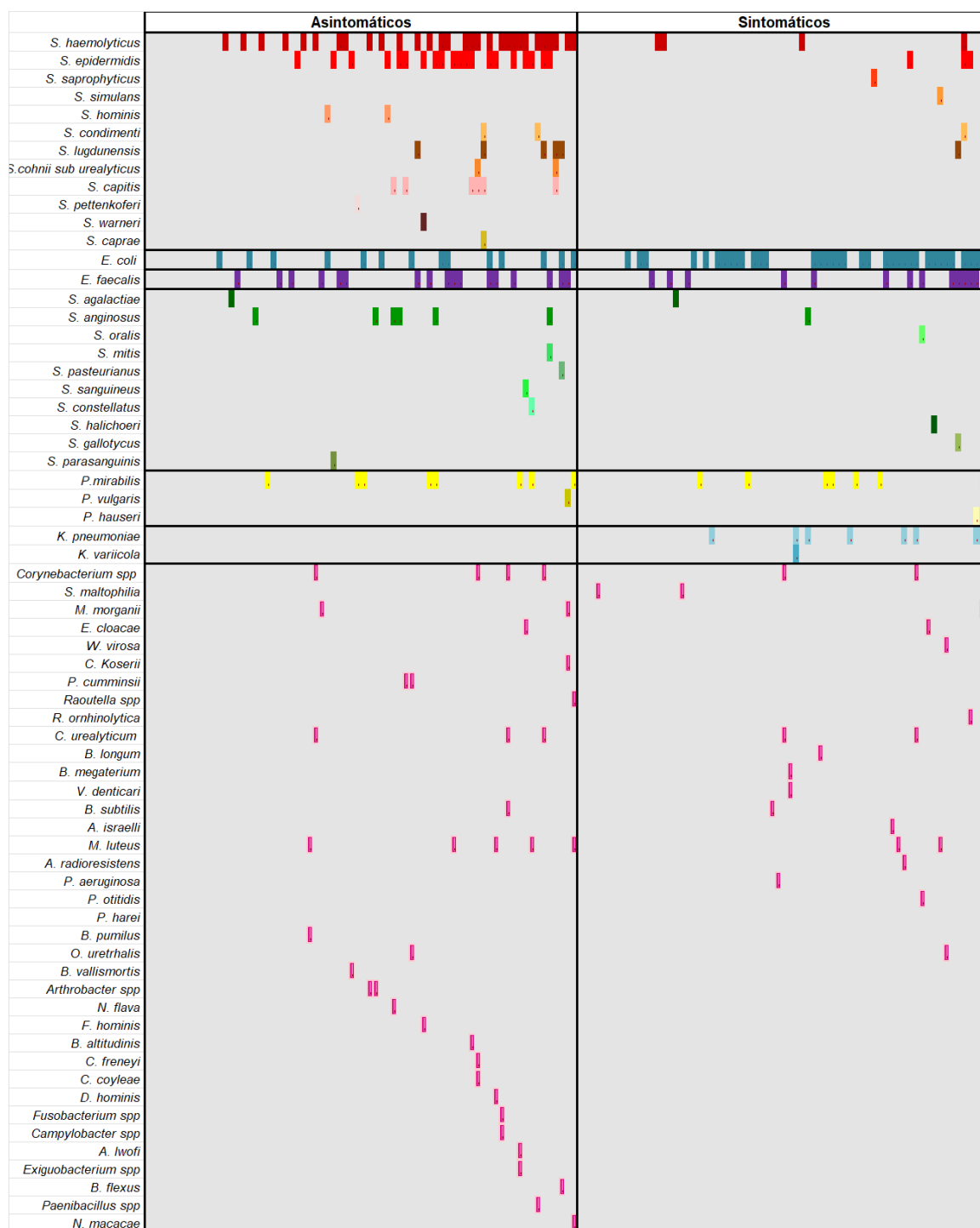


Figura 8. Distribución de los microorganismos en cada individuo según presencia/ausencia de síntomas de ITU. Cada columna representa un individuo. Cada género y especie se representa con color.

5.1.3. Frecuencia de los microorganismos encontrados en la orina según la edad.

Los microorganismos detectados con mayor frecuencia en la población pediátrica fueron: *Staphylococcus spp* (19/50, 38%), *E. coli* (17/50, 34%) y *E. faecalis* (11/50, 22%). En la población adulta se encontraron con mayor frecuencia: *Staphylococcus spp* (37/91, 41%), *E. coli* (32/91, 35%), *E. faecalis* (20/91, 22%) y *Streptococcus spp* (12/91, 13%) (figura 9). El género *Corynebacterium spp* sólo se aisló en la población adulta. No se encontraron diferencias significativas en los microorganismos identificados en cada población.

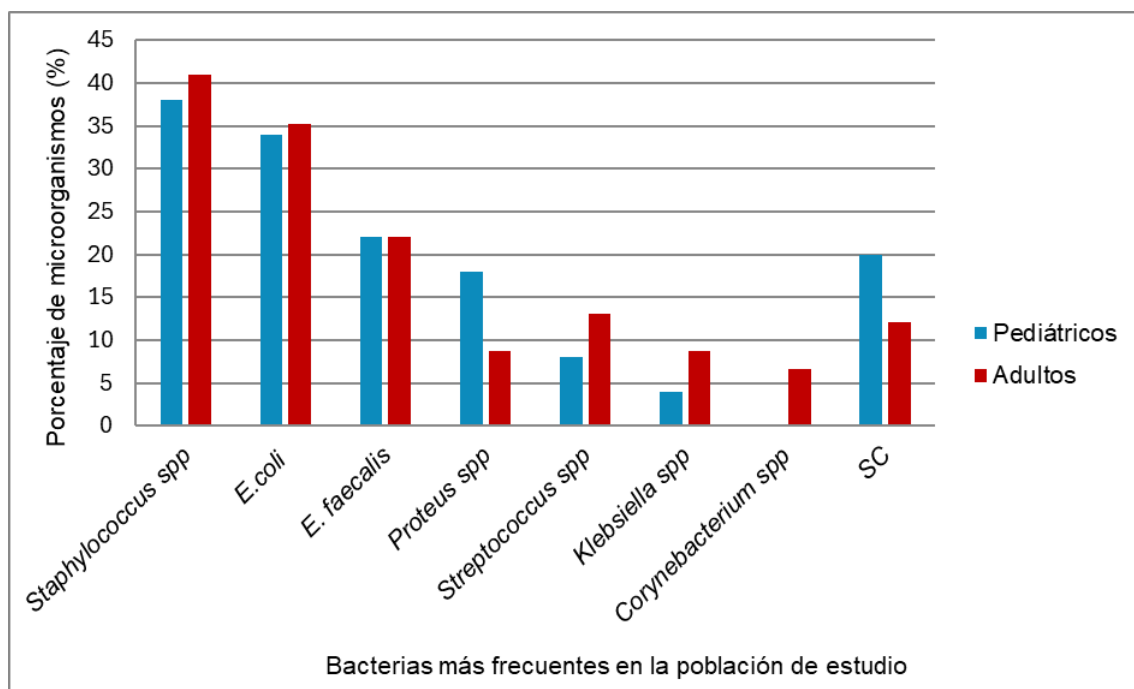


Figura 9. Frecuencia de los microorganismos aislados en la orina según la edad de los individuos. Se incluyen resultados de bacterias que co-existen en un mismo individuo. SC: sin crecimiento de microorganismos.

La distribución de los distintos géneros bacterianos en los individuos asintomáticos y sintomáticos de acuerdo a la edad se muestra en la figura 10. Se observó en pediátricos asintomáticos mayor diversidad de *Staphylococcus spp* y *Streptococcus spp* que en los sintomáticos. Lo mismo ocurrió en adultos.

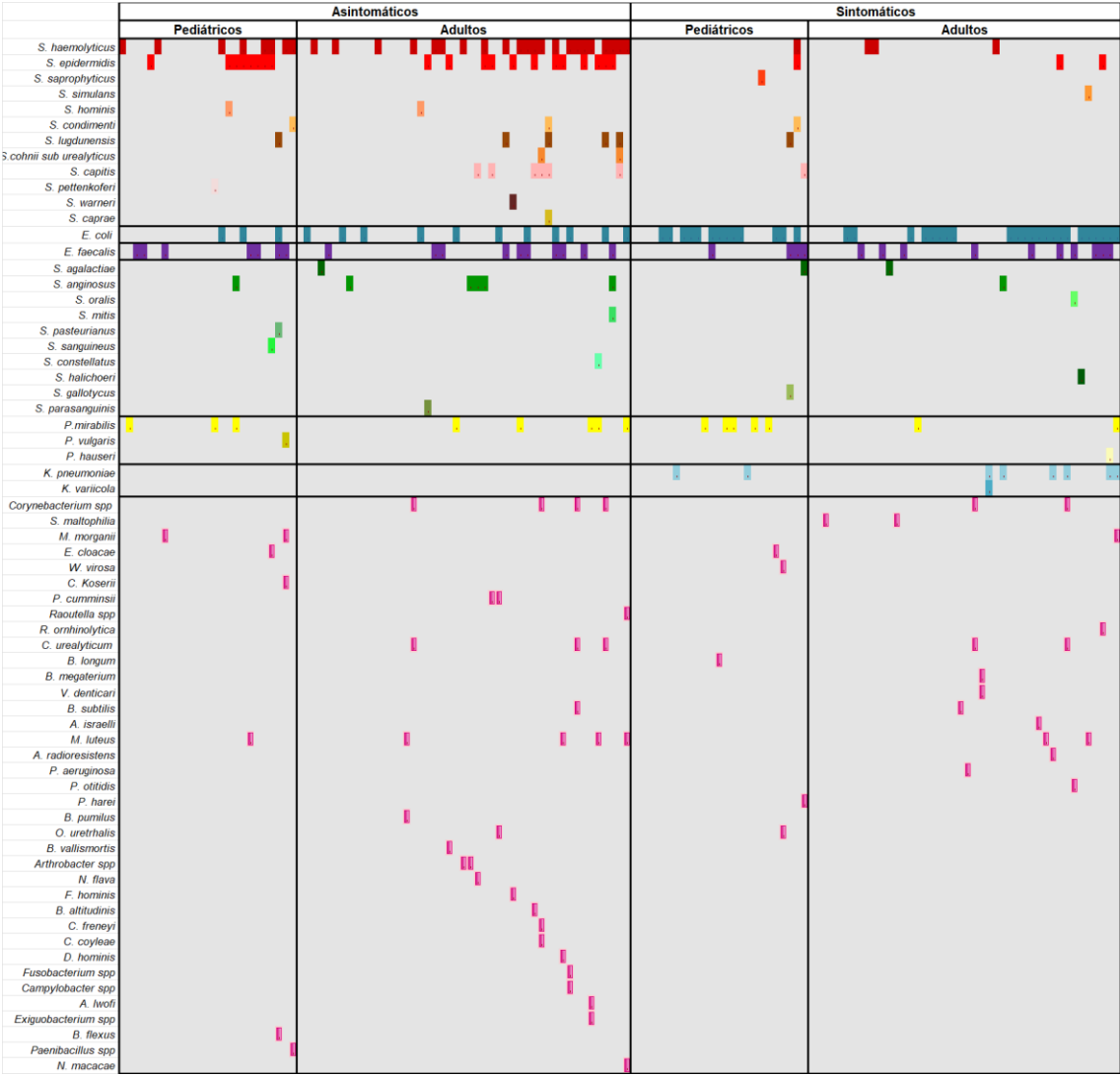


Figura 10. Distribución de los microorganismos según presencia/ausencia de síntomas de ITU y la edad de la población de estudio. Cada columna representa un individuo. Cada género y especie se representa con un color diferente.

5.1.4. Frecuencia de los microorganismos encontrados en la orina según el sexo.

Los microorganismos encontrados con mayor frecuencia en mujeres fueron *E.coli* (41/77, 53%), *Staphylococcus spp* (32/77, 42%) y *E. faecalis* (14/77, 18%) (figura 11). En varones los géneros más frecuentes fueron *Staphylococcus spp* (24/64, 38%) y *E. faecalis* (17/64, 27%), sin diferencias estadísticamente significativas con respecto a los valores encontrados en las mujeres.

Cuando se comparó la presencia de *E.coli* en mujeres respecto a varones se observó una asociación estadística significativa ($p=3,75e^{-7}$). Las mujeres tienen 8 veces más probabilidades de tener *E.coli* que los varones, con un valor de OR 7,97 e IC 95% 3,4-18,9.

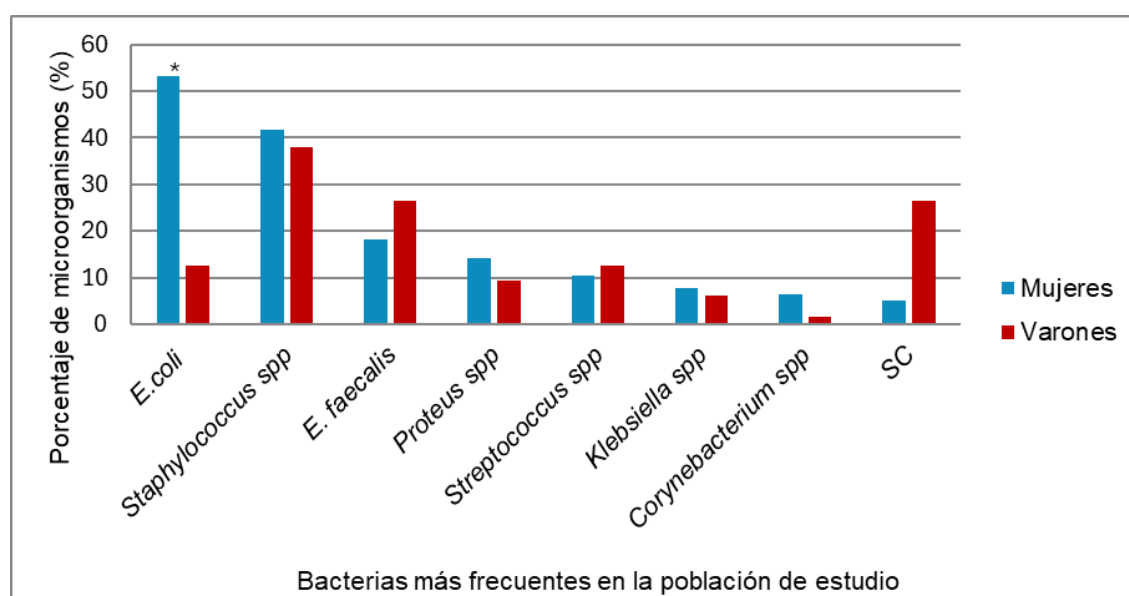


Figura 11. Frecuencia de los microorganismos aislados en la orina según el sexo de los individuos. Se incluyen resultados de bacterias que co-existen en un mismo individuo. SC: sin crecimiento de microorganismos. (*) indica diferencias significativas entre muestras de orina de mujeres y varones, $p \leq 0.05$.

La distribución de los distintos géneros bacterianos en los individuos asintomáticos y sintomáticos de acuerdo al sexo se muestra en la figura 12. Se evidenció en mujeres asintomáticas mayor riqueza de especies de *Staphylococcus spp* así como de otras especies bacterianas que en las sintomáticas, a excepción de *E. coli*.

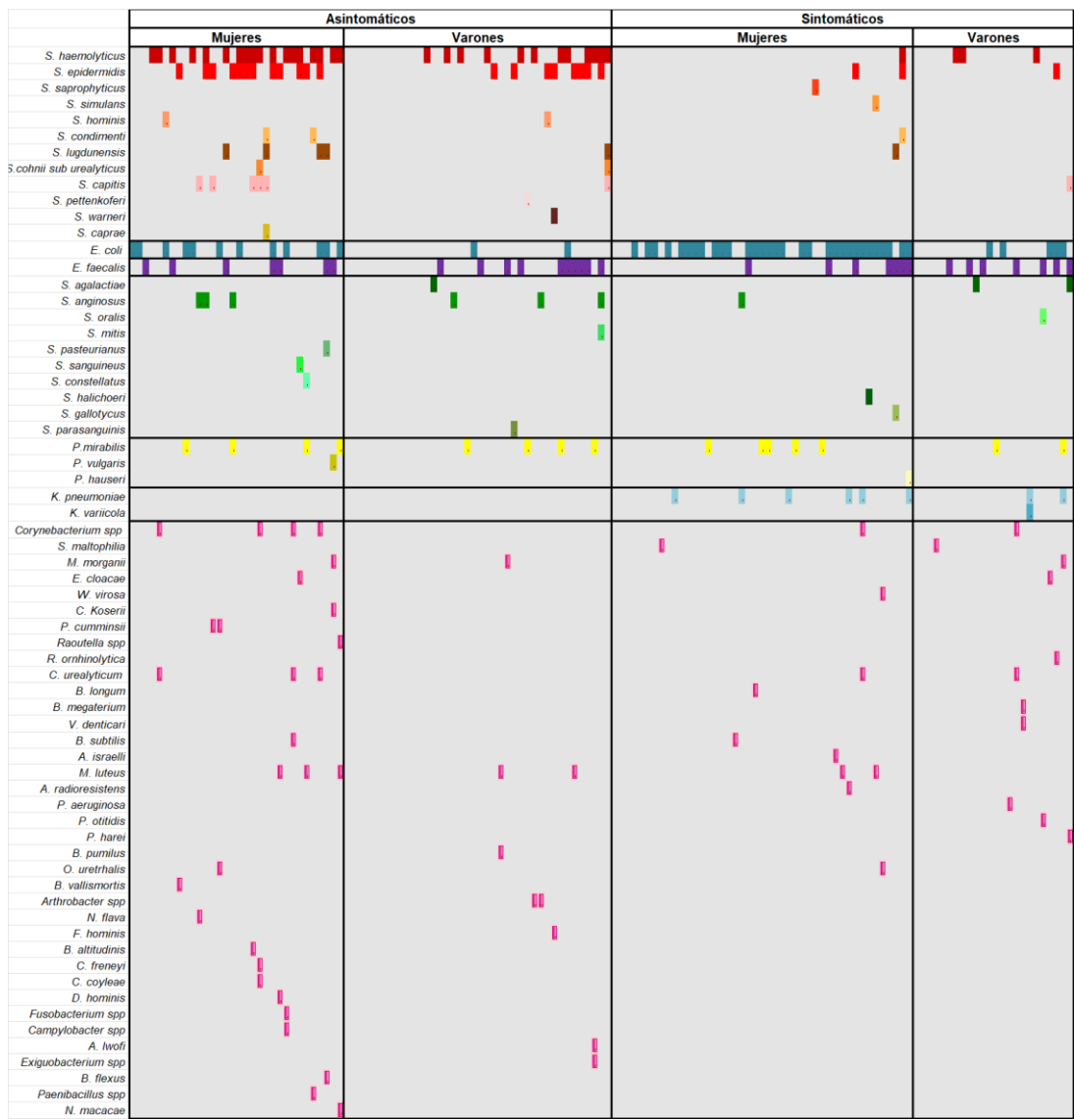


Figura 12. Distribución de los microorganismos según presencia/ausencia de síntomas de ITU y el sexo de la población de estudio. Cada columna representa un individuo. Cada género y especie se representa con color.

5.2 Comparación de las metodologías empleadas para recuperar microorganismos de las muestras de orina.

Al comparar el crecimiento de microorganismos por las técnicas de UE y EQUUC se observó crecimiento en 101/141 individuos (71,6%) por UE y en 131/141 (92,9%) por EQUUC (Ver anexo 1). Por lo tanto, en EQUUC se observó recuperación de microorganismos en 30 muestras de orina (21,3%) que no fueron obtenidos por UE (figura 13).

En éstas 30 muestras se observó crecimiento en EQUUC en alguna de las siguientes condiciones: 16 muestras en la condición A de 100 µL (9 individuos asintomáticos y 7 sintomáticos) y en 2/16 muestras se observó crecimiento exclusivo en esta condición (*Streptococcus spp* y *E. faecalis*); 19 muestras en la condición B (11 individuos asintomáticos y 8 sintomáticos) y en 2/19 muestras se observó crecimiento exclusivo en B (*Staphylococcus spp* y un microorganismo sin crecimiento); y 25 muestras en la condición C (16 individuos asintomáticos y 9 sintomáticos) y en 7/25 muestras se observó crecimiento exclusivo en C (*Klebsiella spp*, *Streptococcus spp*, dos *E. faecalis* y tres microorganismos sin crecimiento).

El urocultivo EQUUC permitió obtener mayor cantidad de microorganismos que UE, sin diferencias estadísticamente significativas entre los individuos asintomáticos y sintomáticos. El EQUUC permite obtener mayor conocimiento de los microorganismos de la orina, pero no generó información relevante para el diagnóstico de ITU respecto a los microorganismos identificados en cada condición.

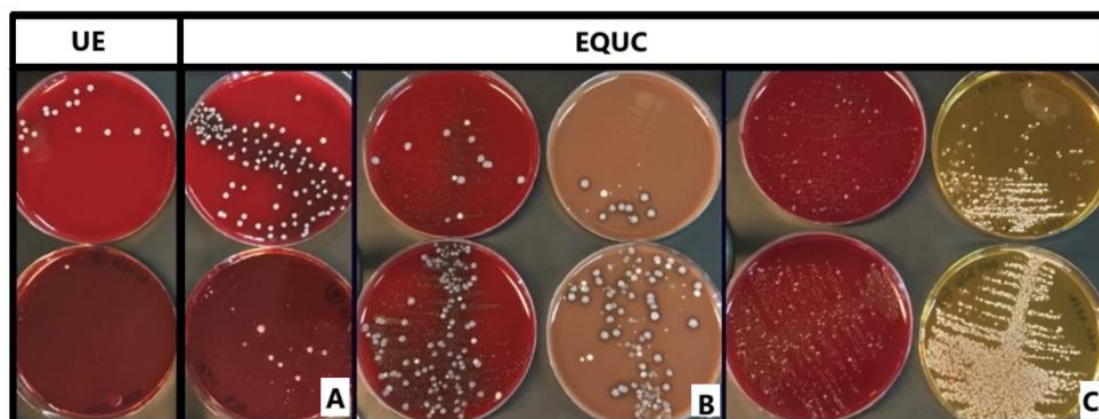


Figura 13. Aislamientos obtenidos por UE: volumen de siembra de muestra de orina de 10 μL en AS-arriba y AMc-abajo (izquierda); y EQUC (derecha): condición A (volumen de siembra de 100 μL en AS-arriba y AMc-abajo), condición B (volumen de siembra de 10 μL en AS y ACh-arriba y 100 μL en AS y ACh-abajo) y condición C (volumen de siembra de 10 μL en AS y MRS-arriba y 100 μL en AS y MRS-abajo).

En 63/91 (69%) muestras de orina de personas adultas hubo crecimiento de microorganismos en UE, 43 eran mujeres y 20 varones. En 85/91 (93%) muestras de esta población se evidenció crecimiento de microorganismos en EQUC, 45 eran mujeres y 40 varones (figura 14).

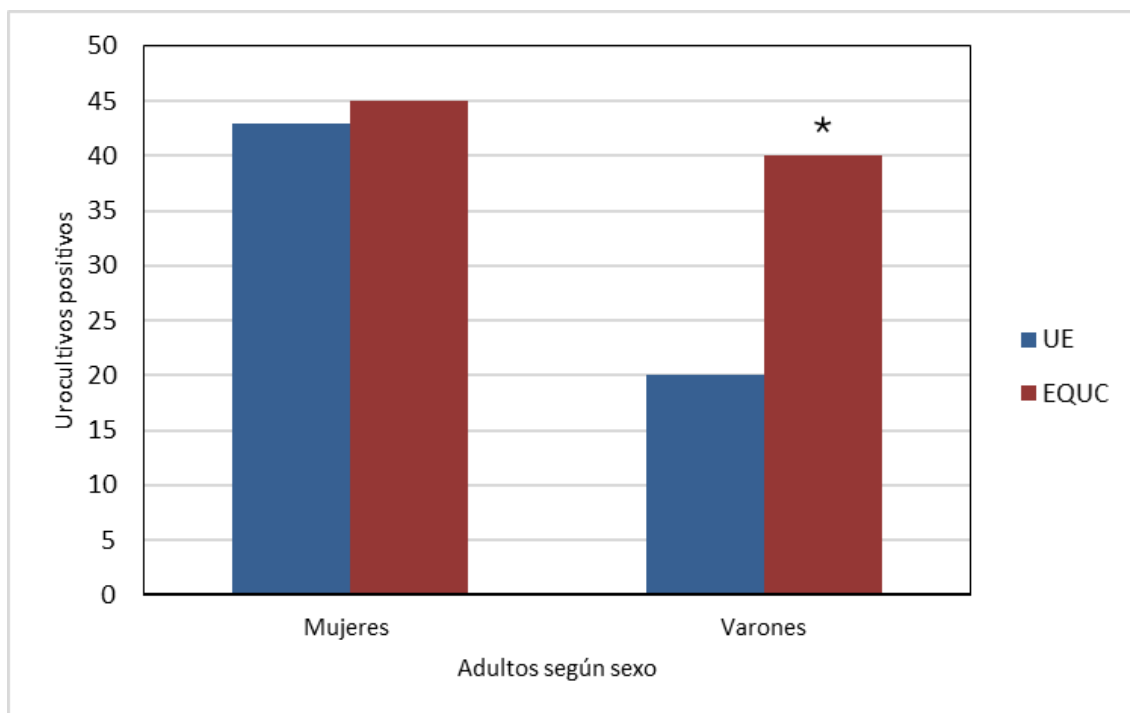


Figura 14. Número de urocultivos positivos en la población adulta. (*) indica diferencias significativas entre muestras de orina de varones con UE y con EQUC, $p \leq 0.05$.

Se observó el doble de recuperación de microorganismos en varones con EQUC respecto a la técnica estándar siendo esta diferencia significativa ($p=2,0e^{-6}$), mientras que en las muestras provenientes de mujeres no se observaron diferencias significativas entre realizar una técnica u otra.

Si comparamos la recuperación de microorganismos por UE y EQUC según la presencia o ausencia de síntomas de ITU, se observó que en varones la técnica de EQUC presentó mayor crecimiento que UE tanto en sintomáticos como asintomáticos, con significancia estadística ($p=0,002$). En el caso de las mujeres no se encontraron diferencias significativas (figura 15).

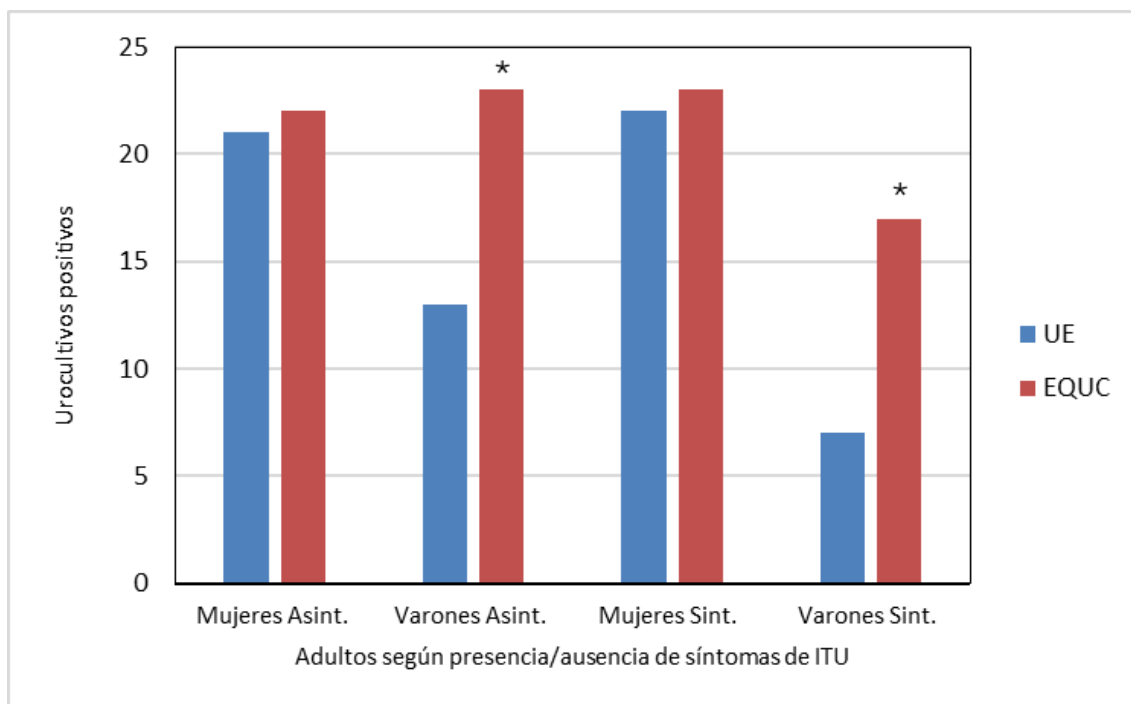


Figura 15. Número de urocultivos positivos en la población adulta de acuerdo a la presencia/ausencia de síntomas de ITU. Asint: asintomáticos; Sint: sintomáticos. (*) indica diferencias significativas entre muestras de orina de varones asintomáticos y sintomáticos respecto a las muestras de orina de mujeres de ambos grupos, $p \leq 0.05$.

En 38/50 (76%) muestras de orina de la población pediátrica hubo crecimiento de microorganismos en UE, 26 eran niñas y 12 varones. En 46/50 (92%) muestras de esta población se evidenció crecimiento de microorganismos en EQUC, 29 eran niñas y 17 varones (figura 16).

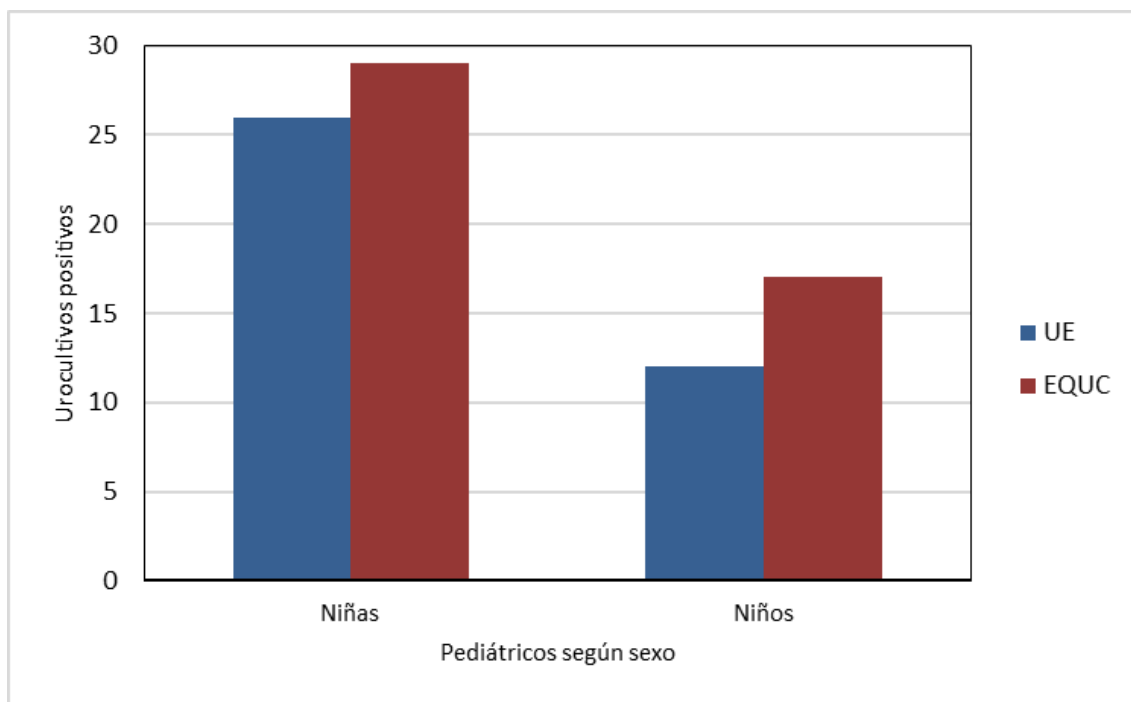


Figura 16. Número de urocultivos positivos en la población pediátrica.

En ambos grupos se recuperaron más microorganismos mediante EQUC, sin diferencias estadísticamente significativas.

En pediátricos asintomáticos se observó mayor crecimiento de microorganismos en EQUC, mientras que no hubo diferencias entre ambas técnicas en los sintomáticos (figura 17).

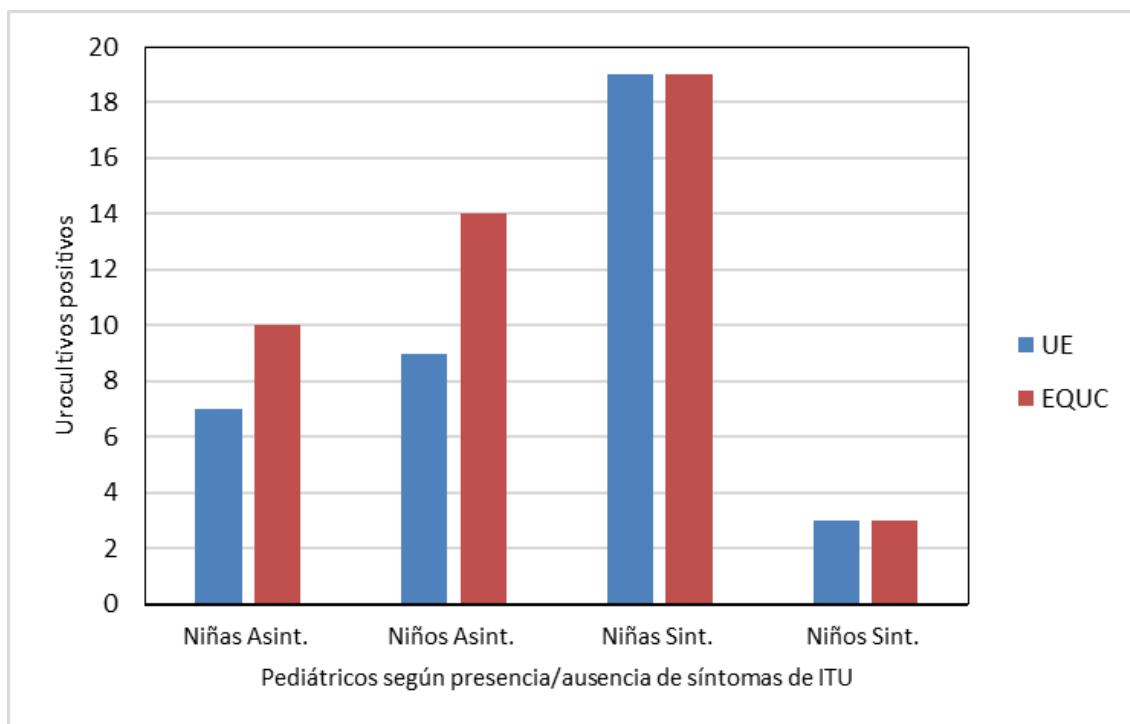


Figura 17. Número de urocultivos positivos en la población pediátrica de acuerdo a la presencia/ausencia de síntomas de ITU. Asint: asintomáticos; Sint: sintomáticos.

5.3 Identificación de los microorganismos intracelulares presentes en la orina.

5.3.1. Detección de bacterias intracelulares en células descamadas en orina.

La presencia de bacterias intracelulares se evaluó mediante un método dependiente de cultivo desarrollado en el presente trabajo. El método consistió en la centrifugación de la orina para concentrar las células descamadas, un siguiente paso de eliminación de bacterias extracelulares con gentamicina y un último paso de lisis celular para liberar las bacterias intracelulares. Se cultivó cada paso del procedimiento. Como control del paso de eliminación de bacterias extracelulares (luego del uso de la gentamicina) se cultivaron 50 μ L en agar sangre y no se observó crecimiento bacteriano en ningún caso. Las colonias

aisladas luego de la lisis celular con Tritón (intracelulares) se identificaron mediante MALDI-TOF.

Observamos la presencia de bacterias intracelulares en 72/141 muestras de orina (51,1%): 42 eran mujeres y 30 eran varones. Observamos una asociación significativa entre la presencia de síntomas y la presencia de bacterias intracelulares ($p=0,007$) ya que 43 pacientes tenían síntomas (65%) y 28 eran asintomáticos (38%). El grupo que tenía síntomas y bacterias intracelulares estaba constituido por 29 mujeres y 14 varones. Observamos una asociación significativa entre la presencia de bacterias intracelulares, síntomas y mujeres ($p=0,03$). Cuando analizamos el grupo de asintomáticos con bacterias intracelulares, 13 eran mujeres y 16 eran varones.

Todas las muestras centrifugadas evidenciaron la presencia de células epiteliales descamadas de la vejiga, algunas de ellas también mostraron bacterias, desechos y células inmunes. Esto revela una gran heterogeneidad entre las muestras.

Se confirmó la presencia de bacterias intracelulares mediante tinción por inmunofluorescencia y visualización por MLC. En la figura 18 se muestran imágenes representativas de muestras de orina con bacterias intracelulares.

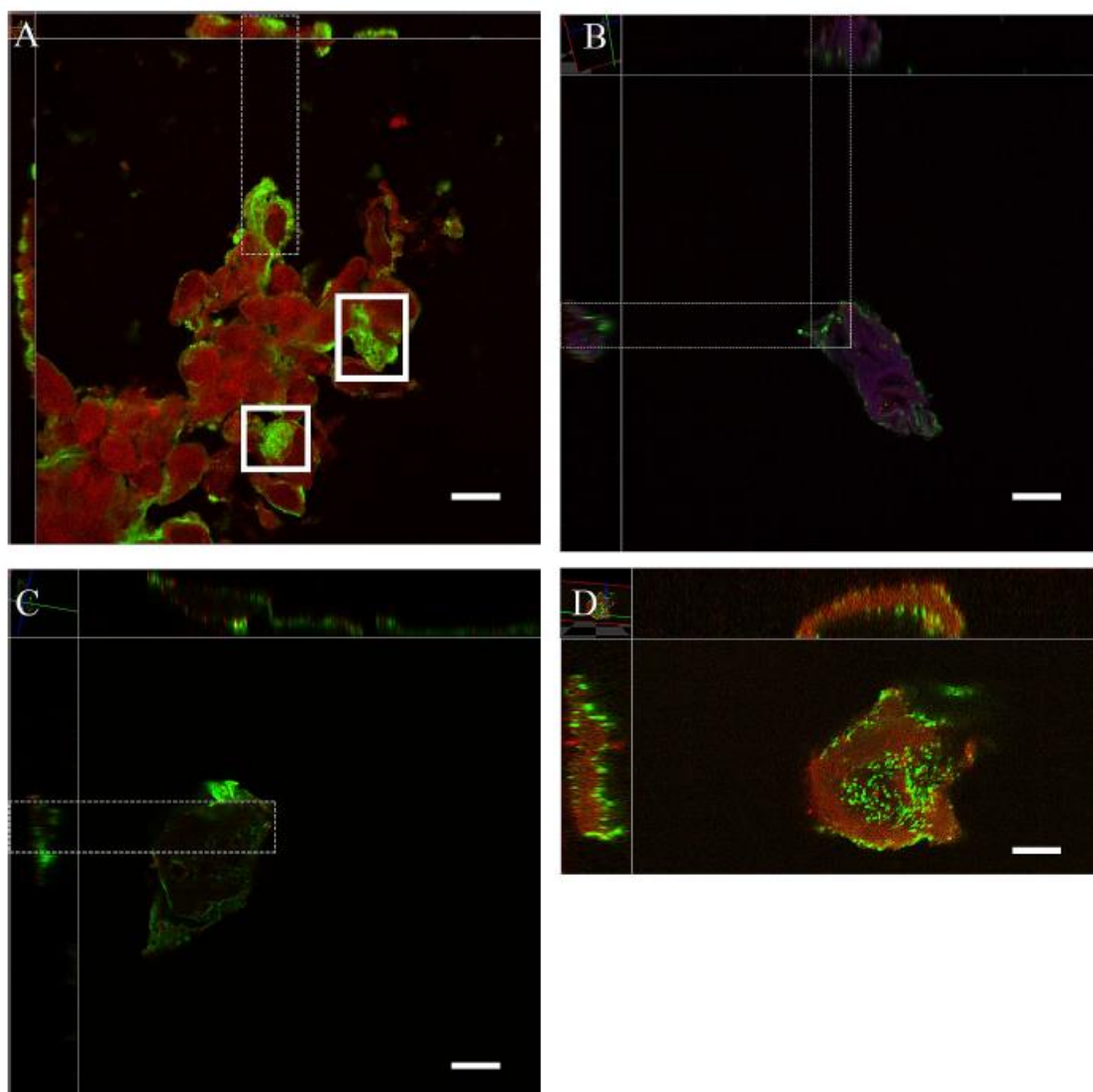


Figura 18. Imágenes representativas de células de orina descamadas de la vejiga observadas por microscopía láser confocal (A) *K. pneumoniae*, (B) *S. haemolyticus*, (C) *S. maltophilia* y (D) *E. coli*. Las bacterias se tiñeron con WGA 488 (verde), anticuerpos primarios anti uroplaquina III de cabra, anticabra de burro Alexa Fluor 568 inmunoglobulina G como anticuerpo secundario (rojo) y Hoescht 33342 (azul). La barra de escala representa 10 μm .

5.3.2. Agentes etiológicos encontrados intracelularmente y comparación con los microorganismos presentes en el urocultivo estándar.

De los 72 casos con bacterias intracelulares, en 56 pudimos identificar el agente etiológico. En 16 muestras no pudimos identificar el microorganismo, ya sea porque las bacterias no crecieron después de recuperarlas de -80°C o porque el resultado de MALDI-TOF fue “no identificado”. Además, en dos pacientes identificamos dos microorganismos intracelulares concomitantemente: *E. cloacae*/*E. coli* en un caso y *E. faecalis*/*P. mirabilis* en el otro caso, demostrando que más de una especie bacteriana a la vez pueden invadir células de la vejiga. Cincuenta y ocho de 72 muestras de orina con bacterias intracelulares también presentaron crecimiento de colonias en el UE. En 24/56 muestras se identificó el mismo microorganismo intracelularmente y en el urocultivo: en 14/24 se encontró *E. coli*, en 6/24 *Staphylococcus spp*, en 2/24 *E. faecalis* y en 1/24 *P. vulgaris* y *S. maltophilia*. En el caso de las 14 muestras con bacterias intracelulares pero sin colonias en UE, 8 correspondían a individuos sintomáticos (varones con uropatías) y 6 eran asintomáticos (2 mujeres y 4 varones).

La bacteria intracelular más frecuente fue *E. coli* en 20 muestras (35,7%), seguida de *S. maltophilia* en 8 casos (14,2%), *Staphylococcus spp* en 8 muestras (14,2%), *E. faecalis* en 6 (10,7%), *Proteus spp* en 4 (7,1%), *Klebsiella spp* en 3 (5,3%), *Bacillus spp* en 2 (3,5%) y *Enterobacter cloacae* en 2 muestras (3,5%) (Figura 19). Las otras bacterias intracelulares detectadas sólo en un caso fueron *Acinetobacter radioresistens*, *Citrobacter koseri*, *Micrococcus luteus* y *Pseudogentamicibacter cumminsii*.

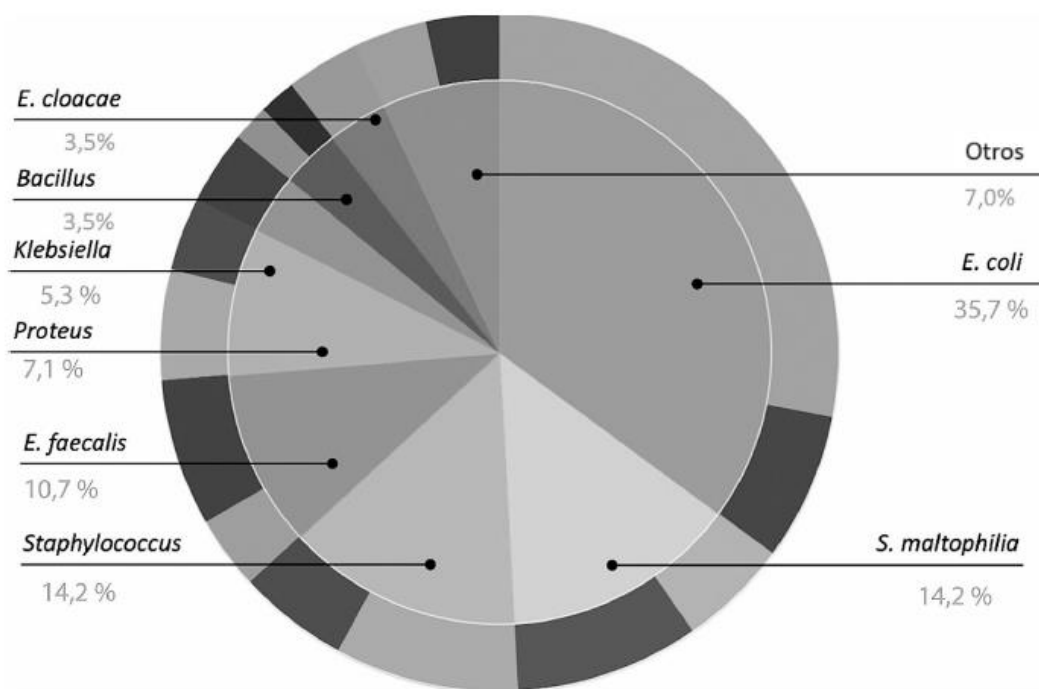


Figura 19. Distribución de las bacterias intracelulares identificadas por MALDI-TOF. En la parte externa del gráfico se representa la proporción de mujeres y varones que tenía el microorganismo. Las mujeres están representadas en color claro y los varones en color oscuro.

En 16/20 muestras donde se detectó *E. coli* intracelularmente, los pacientes pertenecían al grupo sintomático ($p=0,02$). En el caso de *S. maltophilia*, 7 de 8 casos también estaban en el grupo sintomático ($p=0,09$): 5 eran varones ($p=0,006$) y los otros 2 mujeres. Solo en un caso, este microorganismo se encontró en UE. *Staphylococcus spp* también se recuperó de células eucariotas en 8 casos (13,6%), 7 del grupo asintomático ($p=0,006$). La principal especie en este género fue *S. haemolyticus* (5), seguida de *S. epidermidis*, *S. hominis* y *S. saprophyticus* (1 caso cada uno). *E. faecalis* se encontró intracelularmente en 6 casos, 3 de ellos pertenecen al grupo sintomático. *Proteus spp* se encontró en 4 casos (8,6%) y *Klebsiella spp* en 3 casos (5,2%), tanto en grupo de sintomáticos

como asintomáticos. Las especies recuperadas fueron *P. mirabilis* y *P. penneri* y *K. pneumoniae* y *K. variicola*.

6. DISCUSIÓN

El ser humano alberga una variedad de microorganismos (bacterias, hongos, virus y protozoos), aproximadamente diez veces más que células humanas (Sender et al., 2016). Las microbiotas son los microorganismos que residen en un individuo y los microbiomas se refieren a la colección de genomas, genes y productos de los microorganismos (Aragón et al., 2018).

El Proyecto del Microbioma Humano (HMP: Human Microbiome Project), de diez años de duración y organizado en dos fases (HMP1 y HMP2) desarrolló secuencias de referencia, conjuntos de datos multiómicos, herramientas computacionales y estadísticas, y protocolos analíticos/clínicos como recursos para la comunidad de investigación. El HMP1 se centró en la caracterización de comunidades microbianas de numerosos sitios del cuerpo (oral, nasal, vaginal, intestinal y cutáneo) en sujetos adultos sanos. El HMP2 amplió el repertorio de propiedades biológicas analizadas en mujeres embarazadas, enfermedades inflamatorias intestinales y prediabetes (Integrative HMP, Nature, 2019).

El HMP no incluyó la investigación del microbioma del tracto urinario. Inicialmente, se creía que la orina y el tracto urinario de personas sanas eran estériles. La orina contiene una gran cantidad de bacterias, muchas de las cuales no se cultivan de forma rutinaria en los laboratorios de microbiología clínica (Lewis et al., 2013). Una de las dificultades a la hora de analizar los resultados publicados sobre la microbiota es la variedad de metodologías diferentes

utilizadas. Para estudiar la microbiota urinaria se pueden utilizar diversas metodologías: basadas en cultivo o de biología molecular, como la secuenciación del gen ARNr 16S (Fouts et al., 2012).

La técnica de UE consiste en sembrar 10 µL de la muestra de orina en AS, que permite el crecimiento de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, y AMc, medio selectivo para Gram-negativas. Los urocultivos se incuban durante 24 horas, a 35-37°C en aerobiosis antes de su interpretación (Wilson & Gaidó, 2004). La técnica de EQUUC consiste en sembrar 100 µL de la muestra en AS (incubación 48 hs a 35-37°C en aerobiosis), ACh que permite el crecimiento de microorganismos nutricionalmente exigentes (48 hs a 35-37°C en atmósfera de 5% CO₂) y CNA, selectivo para bacterias Gram-positivas (48 hs a 35-37°C en atmósfera de 5% O₂, 10% CO₂ y 85% N₂) (Price et al., 2020; Pérez-Carrasco et al., 2021). En nuestro estudio, se realizaron variaciones en EQUUC: se sembró 100 µL de la muestra en AMc (48 hs a 35-37°C en aerobiosis) y en lugar de CNA, se utilizó el medio MRS, selectivo para bacterias ácido lácticas.

La técnica de EQUUC demostró mayor recuperación de microorganismos (21,3%) respecto al UE, lo que podría tener utilidad en situaciones clínicas específicas, así como para el estudio de la microbiota urinaria. Esta recuperación adicional de microorganismos se observó en cualquiera de las 3 condiciones de cultivo utilizadas. La variedad de condiciones en EQUUC permite la detección de microorganismos con diferentes requerimientos nutricionales, tiempos de incubación y requerimientos atmosféricos. La condición que favorece el crecimiento de bacterias ácido lácticas parece ser particularmente útil, lo que sugiere la importancia de estos microorganismos en la microbiota urinaria.

En el presente trabajo, se detectaron 43 géneros bacterianos diferentes y 66 especies por EQUUC. Otros autores, utilizando la misma técnica en mujeres asintomáticas y con patologías urológicas (vejiga hiperactiva, incontinencia urinaria) han detectado 35 géneros bacterianos diferentes y 85 especies (Hilt et al., 2014). En 2016 Price y su equipo evaluaron técnicas para detectar microorganismos en 150 mujeres (75 asintomáticas y 75 con síntomas de ITU) y encontraron mediante EQUUC 182 especies bacterianas: 110 en muestras con ITU y 72 en muestras sin ITU. Con la técnica de UE detectaron sólo el 33% de los 182 microorganismos, completando un total de 16 géneros bacterianos distintos y 23 especies (Price et al., 2016).

Los hallazgos de estos estudios sugieren que el EQUUC es capaz de proporcionar información complementaria a la técnica de UE para conocer la microbiota urinaria. En nuestro trabajo se observó significativamente el doble de recuperación de microorganismos en varones (tanto sintomáticos como asintomáticos) con EQUUC respecto a la técnica de UE. Esto concuerda con lo reportado por Bajic y colaboradores, que la técnica de EQUUC podría ser especialmente útil para evaluar la microbiota urinaria en varones (Bajic et al., 2020).

En el grupo de pediatría se observó mayor crecimiento de microorganismos en EQUUC en aquellos asintomáticos, mientras que no hubo diferencias entre ambas técnicas en los sintomáticos. Esto apoya la utilidad de la técnica de EQUUC para el estudio de la microbiota urinaria, sin un aporte significativo al diagnóstico de ITU.

En el caso de los pacientes con sospecha de ITU el resultado debe ser interpretado según el contexto clínico para evitar sobrediagnósticos, sobre todo

con algunos microorganismos de dudosa patogenicidad (Price et al., 2016; Coorevits et al., 2017).

Los resultados obtenidos en éste estudio respaldan el concepto de que la orina no es estéril y presenta una microbiota urinaria tanto en individuos sanos como en pacientes con sospecha de ITU u otras patologías urológicas como ha sido reportado previamente (Wolfe et al., 2012; Hilt et al., 2014). *Staphylococcus spp* y *E.coli* fueron los géneros bacterianos más frecuentes en nuestro estudio, seguidos de *E. faecalis*, *Proteus spp* y *Streptococcus spp*.

En los individuos asintomáticos *Staphylococcus spp* fue significativamente más frecuente sugiriendo un posible papel protector. Su alta prevalencia en esta población cuestiona su rol patogénico en el tracto urinario. Esto concuerda con lo reportado en un estudio para mapear la microbiota urinaria de población sana, que detectaron como género más prevalente *Staphylococcus spp* (*S. epidermidis*) (Coorevits et al., 2017). En nuestro trabajo se identificaron 12 especies diferentes de *Staphylococcus spp*, siendo *S. epidermidis* la más frecuente. No se detectó *S. aureus* entre las muestras de este estudio. Esta especie es un patógeno poco frecuente del tracto urinario y forma parte de la microbiota de la piel en humanos (Flores-Mireles et al., 2015).

El principal agente etiológico de las ITU es *E. coli*, independientemente de la edad o sexo. En niños con ITU los patógenos más comunes, detectados utilizando secuenciación fueron *E.coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* y *E. faecalis* (Lemberger et al., 2021). En adultos con ITU el principal uropatógeno es *E.coli* (75%) seguido de *K. pneumoniae* (6%), *S. saprophyticus* (6%) y *E. faecalis* (5%), y otros en menor porcentaje: *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *Candida spp* (Flores-Mireles et al., 2015, Khasriya et al., 2013; Verón

et al., 2015; Haiko et al., 2016; Oros et al., 2020). En nuestro estudio, los principales microorganismos detectados en pacientes sintomáticos fueron *E. coli*, *E. faecalis*, *Staphylococcus spp* y *Klebsiella spp*. La asociación de *E. coli* y *Klebsiella spp* con la presencia de sintomatología refuerza su importancia como patógenos urinarios.

En éste trabajo se observó más riqueza de bacterias en la orina de pacientes asintomáticos respecto a los sintomáticos. No se encontraron diferencias significativas entre los microorganismos aislados de población pediátrica y adulta, sugiriendo que la edad podría no ser un factor determinante en la microbiota urinaria (Wolfe et al., 2012; Coorevits et al., 2017). Cabe destacar que en éste estudio no se incluyeron recién nacidos y lactantes pequeños, en quienes podría especularse que hubieran diferencias en la microbiota urinaria.

En los 50 individuos pediátricos encontramos con mayor frecuencia *Staphylococcus spp*, *E. coli* y *E. faecalis*.

Kinneman y colaboradores evaluaron muestras de orina de 85 niñas/niños (asintomáticos y menores de 4 años) y los cinco géneros predominantes utilizando secuenciación fueron *Prevotella spp*, *Peptoniphilus spp*, *Escherichia spp*, *Veillonella spp* y *Finegoldia spp* (Kinneman et al., 2020). Otro estudio realizado por Kassiri y colaboradores en varones de 3 meses a 8 años de edad (con procedimientos urológicos electivos) no revelaron predominio de ningún género bacteriano en particular, aunque la mayoría de las muestras de orina mostraron mediante secuenciación la presencia de *Staphylococcus spp* y *Varibaculum spp* (Kassiri et al., 2019).

En la población adulta de nuestro estudio se encontraron con mayor frecuencia: *Staphylococcus spp*, *E. coli*, *E. faecalis* y *Streptococcus spp*. El género

Corynebacterium spp se aisló solamente en la población adulta, que también fue reportado por Kustrimovic y su equipo (Kustrimovic et al., 2024). Otros autores detectaron en adultos los géneros bacterianos mencionados y en menor proporción *Prevotella spp*, *Citrobacter spp* y *Lactobacillus spp* (Chorbińska et al. 2023; Kustrimovic et al., 2024).

Una limitante de nuestro trabajo fue la identificación del género *Lactobacillus spp*. En la condición C de EQUUC que permite el crecimiento de bacterias ácido lácticas, obtuvimos crecimiento en 120/141 muestras. De éstas sólo 9 pudieron ser identificadas como *Lactobacillus spp* por MALDI-TOF. Las restantes cepas no pudieron ser identificadas por varios motivos: baja recuperación de los aislamientos criopreservados a -80°C; la base de datos de MALDI-TOF puede no contener perfiles espectrales para todas las especies de *Lactobacillus spp*; presencia de contaminantes en las placas de la condición C que alteraron los resultados; susceptibilidad de este género por los procesos de congelación y descongelación que alteran el patrón proteico afectando los perfiles espectrales e insuficiencia de la biomasa bacteriana en el medio de cultivo que resultó en espectros de baja calidad. Varios autores han detectado *Lactobacillus spp* en individuos sanos y con síntomas de tracto urinario (Hilt et al., 2014; Pearce et al., 2014; Thomas-White et al., 2018; Price et al., 2020; Jacobs et al., 2021). Estos microorganismos se han encontrado principalmente en la microbiota urinaria de mujeres sanas, sobre todo en mujeres premenopáusicas. Observaron que se trata de un género dominante en aproximadamente el 45% de las muestras de orina de mujeres sin síntomas urinarios. La presencia o ausencia de *Lactobacillus spp* por sí sola no es indicativa de salud o enfermedad, sino que

es parte de un ecosistema microbiano complejo cuyo balance puede influir en la salud urogenital (Pearce et al., 2014).

Los microorganismos encontrados con mayor frecuencia en mujeres fueron *E.coli*, *Staphylococcus spp* y *E. faecalis*. *E. coli* fue significativamente más frecuente en mujeres, consistente con la mayor incidencia de ITU en mujeres reportada en la literatura, siendo el patógeno más común adquirido y responsable del 85% de los casos (Erdem et al., 2018). Otros autores además incluyen en la microbiota urinaria femenina: *Lactobacillus spp*, *Gardnerella spp*, *Prevotella spp*, *Corynebacterium spp*, *Sneathia spp*, *Streptococcus spp*, *Aerococcus spp*, *Alloscardovia spp*, *Anaerococcus spp*, *Bifidobacterium spp*, *Fingoldia spp* y *Klebsiella spp* (Kustrimovic et al., 2024).

En varones los géneros más frecuentes detectados fueron *Staphylococcus spp* y *E. faecalis*. Kustrimovic y colaboradores identificaron éstos microorganismos en varones junto con *Corynebacterium spp* y *Streptococcus spp* (Kustrimovic et al., 2024). La prevalencia de bacteriuria es muy variable entre los sexos y durante la vida. Las mujeres presentan mayor heterogeneidad de géneros bacterianos respecto a los varones. La infancia es el único período de la vida durante el cual los varones tienen un riesgo mayor de bacteriuria e ITU que las mujeres. Durante la edad adulta, la prevalencia de bacteriuria es mayor en las mujeres y aumenta con la edad en los varones o durante el embarazo en las mujeres. La diferencia en la incidencia entre mujeres y varones disminuye en los adultos mayores y ambos sexos pueden tener infección recurrente después de los 85 años (Deltourbe et al., 2022).

Otro aspecto que ha cobrado relevancia para comprender la patogenia de ITU ha sido la detección de bacterias intracelulares. Estas han sido detectadas en

pacientes con ITU u otras patologías urológicas. Pero, hasta nuestro conocimiento, no hay reportes de la detección de bacterias intracelulares en personas asintomáticas como parte de la microbiota urinaria.

En este trabajo, reportamos por primera vez la presencia de bacterias intracelulares en la vejiga de personas asintomáticas, así como en pacientes con síntomas de ITU. Aunque existe una asociación significativa entre la presencia de bacterias intracelulares y mujeres con síntomas urinarios, pudimos detectar bacterias intracelulares en los otros grupos, incluidas las personas asintomáticas.

En nuestro estudio, *Staphylococcus spp* fue el género más frecuente detectado intracelularmente en el grupo asintomático, tanto en mujeres como en varones. Este género también se detectó extracelularmente en la mayoría de estos casos, respaldando el concepto de *Staphylococcus spp* como un microorganismo saludable en mujeres y varones, viviendo intra o extracelularmente. *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa negativo* clásicamente se consideraban patógenos extracelulares. Pero en la última década, se demostró su capacidad para internalizarse en células fagocíticas y no fagocíticas, y ahora se aceptan como patógenos intracelulares facultativos (Watkins & Unnikrishnan, 2020; Bogut & Magryś, 2021). Su presencia se ha evidenciado en células del epitelio respiratorio, piel y células óseas como osteoblastos y osteoclastos. Hasta donde sabemos, no se ha descrito dentro de células de la vejiga. Algunas de las bacterias intracelulares son variantes de colonias pequeñas, con un estado metabólico quiescente y una respuesta inmune reducida que aumenta su capacidad para persistir en el huésped (Bogut & Magryś, 2021).

E. coli ha sido detectada intracelularmente produciendo CBI, lo cual está relacionado con la alta recurrencia de la infección (Rosen et al., 2007; Robino et al., 2013; Robino et al., 2014b; Dikshit et al., 2015). En este estudio, *E. coli* fue la bacteria intracelular más frecuentemente detectada y su presencia se asoció estadísticamente con ITU, principalmente en mujeres.

Otro microorganismo detectado intracelularmente fue *S. maltophilia*, que se asoció significativamente con el grupo de varones sintomáticos. Esta bacteria es un bacilo Gram-negativo y se considera un agente nosocomial emergente, que causa principalmente infecciones del tracto respiratorio. En los últimos años, se ha reportado como agente de ITU en casos particularmente graves, como en pacientes con inmunocompromiso, catéter permanente, tratamiento antibiótico prolongado y estadía prolongada en cuidados intensivos. Puede formar biofilms que podrían vincularse con un aumento en la resistencia antimicrobiana, junto con la resistencia reportada de *S. maltophilia*. La presencia de *S. maltophilia* intracelular podría servir como reservorio para ITU, ya que detectamos la presencia de este microorganismo en varones sintomáticos que no son detectados por el urocultivo estándar. En particular, los casos que tenían *S. maltophilia* intracelularmente eran pacientes con anomalías urológicas como constricción uretral, que eran atendidos regularmente en un centro de salud y estaban expuestos a diferentes procedimientos urológicos (Robino et al., 2024). Otro patógeno que puede invadir las células epiteliales de la vejiga es *E. faecalis*. Se informó que los mecanismos que conducen a la internalización son diferentes a los empleados por *E. coli*. En particular, la invasión de *E. faecalis* está asociada con la actividad hemolítica y su capacidad de formar biofilms (Ogdenovska et al., 2022). La formación de biofilms en *E. faecalis* es una de las causas de

infecciones urinarias asociadas a catéteres (CAUTI) (Nicolle, 2005). En cateterización a largo plazo, se reportó la presencia de infección polimicrobiana y *E. faecalis* fue una de las primeras especies en colonizar el catéter urinario. También se informó que la co-ocurrencia de *P. mirabilis*/*E. faecalis* es una de las más prevalentes y persistentes en CAUTI (Gaston et al., 2020). Además, en el presente trabajo, pudimos observar un caso de co-invasión con *E. faecalis* y *P. mirabilis* confirmando los hallazgos de que estos dos microorganismos co-colonizan en humanos, forman una fuerte asociación de biofilm y viven dentro de la célula eucariota. *E. cloacae* no es muy frecuente en ITU, pero es parte del grupo CESP (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Providencia*) responsable de graves problemas de salud y asociado con altas tasas de resistencia a antibióticos. Un aspecto interesante de este género son las altas tasas de co-infecciones con otros patógenos reportadas en infecciones hepáticas y pulmonares (Dos Santos et al., 2015). Aquí, reportamos una co-ocurrencia intracelular de *E. cloacae* y *E. coli* en una mujer con ITU e infección por *E. coli* reportada por técnica UE. Hasta ahora, este es el primer reporte de la presencia de *E. cloacae* intracelularmente. Los dos casos que se reportaron aquí pertenecen a dos mujeres con síntomas de ITU.

En éste estudio hemos contribuido al conocimiento de la microbiota urinaria, tanto intra como extracelular, en población de individuos asintomáticos y sintomáticos. Una de las limitantes en el estudio de la microbiota es que solo estudiamos microorganismos cultivables. La integración de técnicas de secuenciación de próxima generación podría proporcionar una visión más completa de la diversidad microbiana, incluyendo microorganismos no cultivables. Sin embargo, una desventaja de los estudios del microbioma del

tracto urinario realizados hasta la fecha es que la abundancia y la composición de los microorganismos en el tracto urinario son relativas y se basan en el número total de lecturas de secuencias, que pueden variar ampliamente de un individuo a otro. En el futuro, uno de los desafíos será medir las abundancias absolutas de especies no cultivadas específicas en estudios epidemiológicos más amplios y evaluar los riesgos potenciales que plantea la colonización del tracto urinario con diferentes especies o subconjuntos bacterianos (Kline & Lewis, 2016).

Es importante destacar que este campo de estudio es relativamente nuevo y en constante evolución. Se necesitan más investigaciones para comprender completamente el papel de la microbiota urinaria en la salud y la enfermedad.

7. CONCLUSIONES

Este estudio proporciona evidencia de la naturaleza de la microbiota urinaria y desafía algunos conceptos tradicionales sobre las ITU. Los hallazgos sugieren la necesidad de un enfoque más apropiado en el diagnóstico y tratamiento de las infecciones urinarias, considerando no solo la presencia de patógenos conocidos, sino también del equilibrio general de la microbiota.

El aumento de la resistencia antimicrobiana nos obligará a mejorar los métodos de diagnóstico y tratamiento. Los resultados obtenidos sugieren que la técnica de UE (“gold standard”) es adecuada para el diagnóstico de ITU en la mayoría de los casos pero no es suficiente para conocer la microbiota cultivable que habita en el tracto urinario. Se sugiere realizar la técnica de cultivo de EQUIC para indagar en la riqueza de la microbiota urinaria.

El método de cultivo de bacterias intracelulares desarrollado podría ser una técnica a implementar para algunos pacientes particulares y para el estudio de la microbiota urinaria. Una limitante de este método es que solo se utilizó un medio de cultivo y una condición de incubación para recuperar bacterias intracelulares. Como aún no se ha evaluado, una gran mejora podría ser usar otros medios y condiciones anaeróbicas, así como secuenciar todas las bacterias intracelulares.

Además, surgen nuevas preguntas ya que las personas sanas tienen bacterias intracelulares, la mayoría de ellas *Staphylococcus spp*: ¿son estas bacterias intracelulares protectoras contra otros microorganismos uropatógenos?, ¿cómo controlan estos reservorios las personas sanas con microorganismos intracelulares?, ¿podrían las nuevas estrategias que promueven el control de estos microorganismos intracelulares prevenir las ITU?

Para responder estas preguntas se necesitan estudios prospectivos clínico-microbiológicos y también investigación del urobioma con métodos no dependientes de cultivo como la secuenciación del gen ARNr 16S. Los resultados de este estudio tienen implicaciones significativas para el diagnóstico y tratamiento de las ITU. La detección de una microbiota urinaria diversa en individuos asintomáticos, así como la presencia de bacterias intracelulares, sugiere que es necesario reconsiderar los enfoques diagnósticos actuales. El uso de la técnica EQUIC y la búsqueda de bacterias intracelulares podrían mejorar la precisión diagnóstica. Además, el conocimiento de la microbiota urinaria en personas sanas podría llevar al desarrollo de terapias probióticas o a enfoques que busquen restaurar el equilibrio microbiano. Esto resultaría en

tratamientos más efectivos y en una reducción del uso innecesario de antibióticos, contribuyendo a combatir la resistencia antimicrobiana.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afzaal M, Saeed F, Shah YA, Hussain M, Rabail R, Socol CT, Hassoun A, Pateiro M, Lorenzo JM, Rusu AV y Aadil RM. Human gut microbiota in health and disease: Unveiling the relationship. *Front. Microbiol.* 2022; 13:999001.

Alonso B, Bernadá M, Pereda M, Traversa M, Lechini R, Mariño S, et al. Infección urinaria en niños: agentes patógenos y sensibilidad antibiótica. *Arch Pediatr Urug.* 2001; 72(4): p. 268-273.

Anderson GG, Palermo JJ, Schilling JD, Roth R, Heuser J, Hultgren SJ. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science.* 2003; 301 (5629): p. 105-107.

Antunes-lobes T, Vale L, Coelho AM, Silva C, Rieken M, Bogdan Geavlete B, Rashid T, Sajjad Rahnama'I S, Cornu JN, Marcelissen T. The role of urinary microbiota in lower urinary tract dysfunction: a systematic review. *European urology focus.* 2020; 6 (2): p. 361-369.

Aragón IM, Herrera-Imbroda B, Queipo-Ortuño MI, Castillo E, Del Moral JS, Gómez-Millán J, Yucel G, Lara MF. The Urinary Tract Microbiome in Health and Disease. *Eur Urol Focus.* 2018;4(1):p. 128-138.

Bajic P, Van Kuiken ME, Burge BK, Kirshenbaum EJ, Joyce CJ, Wolfe AJ, Branch JD, Bresler L, Farooq AV. Male Bladder Microbiome Relates to Lower Urinary Tract Symptoms. *Eur Urol Focus*. 2020; 15; 6(2):p. 376-382.

Barber AE, Norton JP, Spivak AM, Mulvey MA. Urinary Tract Infections: Current and Emerging Management Strategies. *Clin Infect Dis*. 2013; 57 (5): p. 719-724.

Barola S, Grossman OK, Abdelhalim A. Urinary Tract Infections In Children. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024.

Barrios-Villa E, Mendez-Pfeiffer P, Valencia D, Caporal-Hernández L, Ballesteros-Monrreal MG. Intracellular bacterial communities in patient with recurrent urinary tract infection caused by *Staphylococcus spp* and *Streptococcus agalactiae*: a case report and literature review. *Afr J Urol*. 2022, 28: p. 46-53.

Biagi E, Nylund L, Candela M, Ostan R, Bucci L, Pini E, Nikkila J, Monti D, Satokari R, Franceschi C, Brigidi P, De Vos W. Through ageing and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. *PLoS ONE*. 2010; 5, e10667.

Bogut A, Magryś A. The road to success of coagulase-negative staphylococci: clinical significance of small colony variants and their pathogenic role in persistent infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2021; 40(11):p. 2249-2270.

Bonkat G, Bartoletti R, Bruyère F, Cai T, Geerlings SE, Köves B et al. EAU Guidelines on Urological Infections. *European Association of Urology*. 2023.

Brubaker L, Wolfe AJ. The female urinary microbiota, urinary health and common urinary disorders. *Ann Transl Med.* 2017;5(2):p. 34.

Caporaso JG, Lauber CL, Costello EK et al. Moving pictures of the human microbiome. *Genome Biol.* 2011; 12, R50.

Chai TC, Wolfe AJ y Brubaker, L The Urinary Microbiome: Improving Diagnostics and Management of Urinary Tract Infections in Adult Females. *Infectious Disease Clinics.* 2024; 38(2): p. 241-253.

Chorbińska J, Krajewski W, Nowak Ł, Małkiewicz B, Del Giudice F, Szydełko T. Urinary Microbiome in Bladder Diseases: Review. *Biomedicines* 2023;11: p. 2816.

Cepnija M, Oros D, Melvan E, Svetlicic E, Skrlin J, Barisic K, Starcevic L, Zucko J y Starcevic A. Modeling of Urinary Microbiota Associated With Cystitis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2021;11:643638.

Clark AE, Kaleta EJ, Arora A y Wolk DM. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin. Microbiol.* 2013; 26 (3):p. 547– 603.

Colella M, Topi S, Palmirotta R, D'Agostino D, Charitos IA, Lovero R, Santacroce L. An Overview of the Microbiota of the Human Urinary Tract in Health and Disease: Current Issues and Perspectives. *Life.* 2023, 13:p. 1486.

Coorevits L, Heytens S, Boelens J. et al. The resident microflora of voided midstream urine of healthy controls: standard versus expanded urine culture protocols. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017; 36:p. 635–639.

Costello EK et al. Bacterial Community Variation in Human Body Habitats Across Space and Time. *Science*. 2009; 326: p. 1694-1697.

Del Campo-Moreno R, Alarcón-Cavero T, D'Auria G, Delgado-Palacio S, Ferrer-Martínez M. Microbiota en la salud humana: técnicas de caracterización y transferencia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2018; 36 (4):p. 241-245.

Deltourbe L, Lacerda ML, Hreha TN, Hunstad DA, Ingersoll MA. The impact of biological sex on diseases of the urinary tract. *Mucosal Immunol*. 2022 May;15(5):p. 857-866.

Dikshit N et al. Intracellular uropathogenic *E. Coli* exploits host Rab35 for iron acquisition and survival within urinary bladder cells. 2015. *PLoS Pathog* 11(8), e1005083.

Dong Q, Nelson DE, Toh E, Diao L, Gao X, et al. The Microbial Communities in Male First Catch Urine Are Highly Similar to Those in Paired Urethral Swab Specimens. *PLoS ONE*. 2011; 6(5): e19709.

Dos Santos GS, Solidônio EG, Costa MC, Melo RO, de Souza IF, Silva G, et al. Study of the Enterobacteriaceae Group CESP. (Citrobacter, Enterobacter, Serratia, Providencia, Morganella and Hafnia): A Review. In: The Battle against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs; Méndez-Vilas A, Ed. Recife, Brazil: Federal University of Pernambuco, 2015:p. 794–805.

El-Sayed A, Aleya L, Kamel M. Microbiota and epigenetics: promising therapeutic approaches?. *Environ Sci Pollut Res*. 2021. 28: p. 49343-49361.

Erdem I, Kara Ali R, Ardic E, Elbasan Omar S, Mutlu R, Topkaya AE. Community-acquired Lower Urinary Tract Infections: Etiology, Antimicrobial Resistance, and Treatment Results in Female Patients. *J Glob Infect Dis*. 2018;10(3): p.129-132.

Fagerquist CK, Garbus BR, Miller WG, Williams KE, Yee E, Bates AH et al. Rapid identification of protein biomarkers of Escherichia coli O157:H7 by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry and top-down proteomics. *Anal Chem*. 2010; 82: p. 2717-2725.

Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature reviews microbiology*. 2015; 13(5): p. 269-284.

Fouts DE, Pieper R, Szpakowski S, Pohl H, Knobloch S, Suh MJ y Groah, SL. Integrated next-generation sequencing of 16S rDNA and metaproteomics differentiate the healthy urine microbiome from asymptomatic bacteriuria in neuropathic bladder associated with spinal cord injury. *Journal of Translational Medicine*. 2012; 10:174.

Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity y economic costs. *The American journal of medicine*. 2002; 113 (1): p. 5-13.

Foxman B, Brown P. Epidemiology of urinary tract infections: transmission and risk factors, incidence, and costs. *Infect dis clin North Am*. 2003; 17(2): p. 227-241.

Gaston JR et al. *Enterococcus faecalis* Polymicrobial interactions facilitate biofilm formation, antibiotic recalcitrance, and Persistent colonization of the Catheterized. *Urinary Tract Pathogens*. 2020;9(10):p. 835.

Gottschick C, Deng ZL, Vital M et al. The urinary microbiota of men and women and its changes in women during bacterial vaginosis and antibiotic treatment. *Microbiome*. 2017; 5; p. 99.

Haiko J, Savolainen LE, Hilla R, Pätäri-Sampo A. Identification of urinary tract pathogens after 3-hours urine culture by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Microbiol Methods*. 2016;129: p. 81-84.

Hilt EE, McKinley K, Pearce MM, Rosenfeld AB, Zilliox MJ, Mueller ER, Brubaker L, Gai X, Wolfe J, Schreckenberger PC. Urine is not sterile: use of enhanced urine culture techniques to detect resident bacterial flora in the adult female bladder. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52: p. 871-876.

Hochstedler-Kramer B et al. One size does not fit all: variability in urinary symptoms and Microbial communities. *Front Urol*. 2022;2:890990.

Hooton TM. Pathogenesis of urinary tract infections: an update. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2000; 46 (1): p. 1-7.

Hooton TM. Uncomplicated urinary tract infection. *New England Journal of Medicine*. 2012; 366, no 11: p. 1028-1037.

Horsley H, Malone-Lee J, Holland D, Tuz M, Hibbert A, et al. *Enterococcus faecalis* Subverts and Invades the Host Urothelium in Patients with Chronic Urinary Tract Infection. *PLOS ONE*. 2013; 8(12): e83637.

Hou K, Wu ZX, Chen XY et al. Microbiota in health and diseases. *Sig Transduct Target Ther*. 2022; 7:p.135.

Hrbacek J, Tlaskal V, Cermak P, Hanacek V, Zachoval R. Bladder Microbiota Are Associated with Clinical Conditions That Extend beyond the Urinary Tract. *Microorganisms*. 2022;10:874.

Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium. The Integrative Human Microbiome Project. *Nature*. 2019;569 (7758).

Iwase T, Uehara Y, Shinji H. et al. *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature*. 2010; 465:p. 346-349.

Jacobs KM, Price TK, Thomas-White K, Halverson T, Davies A, Myers DL, Wolfe AJ. Cultivable Bacteria in Urine of Women With Interstitial Cystitis: (Not) What We Expected. *Female Pelvic Medicine & Reconstructive Surgery*. 2021 27(5):p. 322-327.

Jones J, Murphy CP, Sleator RD, Culligan EP. The urobiome, urinary tract infections, and the need for alternative therapeutics. *Microbial Pathogenesis*, 2021; 161: p. 105295.

Jones-Freeman B, Chonwerawong M, Marcelino V, Deshpande A, Forster S, Starkey M. The microbiome and host mucosal interactions in urinary tract diseases. *Mucosal Immunol*. 2021;14: p. 779-792.

Kartens L, Asquith M, Davin S, Stauffer P, Fair D, Gregory WT, Rosenbaum JT, McWeeney SK y Nardos R. Does the urinary microbiome play a role in urgency urinary incontinence and its severity? *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2016; 6:p.78.

Kassiri B, Shrestha E, Kasprenski M, Antonescu C, Florea LD, Sfanos KS & Wang MH. A Prospective Study of the Urinary and Gastrointestinal Microbiome in Prepubertal Males. *Urology*. 2019; 131:p. 204-210.

Khasriya R, Sathiananthamoorthy S, Ismail S, Kelsey M, Wilson M, Rohn JL, Malone-Lee J. Spectrum of bacterial colonization associated with urothelial cells from patients with chronic lower urinary tract symptoms. *J Clin Microbiol*. 2013;51(7):p. 2054-2062.

Kinneman L, Zhu W, Wong W, Clemency N, Provenzano M, Vilboux T, Jane't K, Seo-Mayer P, Levorson R, Kou M, Ascher D, Niederhuber J & Hourigan S. Assessment of the Urinary Microbiome in Children Younger Than 48 Months. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2020; 39 (7):p. 565-570.

Kline KA, Lewis AL. Gram-Positive Uropathogens, Polymicrobial Urinary Tract Infection and the Emerging Microbiota of the Urinary Tract. *Microbiol Spectr*. 2016;4(2):p. 1-54.

Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, Angenent LT y Ley RE. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2011;108 (1): p. 4578-4585.

Koljalg S, Truusalu K, Vainumae I, Stsepetova, J, Sepp E, Mikelsaar, M. Persistence of *Escherichia coli* clones and phenotypic and genotypic antibiotic resistance in recurrent urinary tract infections in childhood. *J clin microbiol*. 2009; 47(1):p. 99-105.

Komaroff AL. Diagnostic decision: Urinalysis and urine culture in women with dysuria. *Annals of internal medicine*. 1986;104 (2): p. 212-218.

Kunin CM, Van Arsdale White L & Hua Hua T. A reassessment of the importance of low-count bacteriuria in young women with acute urinary symptoms. *Annals of internal medicine*. 1993; 119, (6): p. 454-460.

Kustrimovic N, Bilato G, Mortara L, Baci D. The Urinary Microbiome in Health and Disease: Relevance for Bladder Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25(3):p. 1732.

Lemberger U, Quhal F, Bruchbacher A, Shariat S y Hiess M. The microbiome in urinary tract infections in children – an update. *Current Opinion in Urology*. 2021;31 (2):p. 147-154.

Lewis DA, Brown R, Williams J, White P, Jacobson SK, Marchesi JR, Drake MJ. The human urinary microbiome; bacterial DNA in voided urine of asymptomatic adults. *Front.Cell.Infect.Microbiol*. 2013; vol 3:p.41.

Magistro G & Stief CG. The Urinary Tract Microbiome: The Answer to All Our Open Questions? *Eur Urol Focus*. 2019;5(1): p. 36-38

Mancuso G, Midiri A, Gerace E, Marra M, Zummo S, Biondo C. Urinary Tract Infections: The Current Scenario and Future Prospects. *Pathogens*. 2023; 12: p. 623-639.

Mehnert-Kay SA. Diagnosis and management of uncomplicated urinary tract infections. *Am Fam Physician*. 2005;72(3): p. 451-456.

Morand A, Cornu F, Dufour J, Tsimaratos M, Lagier J, Raoult D. Human Bacterial Repertoire of the Urinary Tract: a Potential Paradigm Shift. *J Clin Microbiol*. 2019; 57:10.

Mulvey MA, Schilling JD, Hultgren SJ. Establishment of a Persistent *Escherichia coli* Reservoir during the Acute Phase of a Bladder Infection. *Infect Immun*. 2001; 69 (7): p. 4572-4579.

Nelson DE, Van der Pol B, Dong Q, Revanna KV, Fan B, Easwaran S et al. Characteristic Male Urine Microbiomes Associate With Asymptomatic Sexually Transmitted Infection. *PloS One*. 2010; 24,5 (11).

Nelson DE, Dong Q, Van Der Pol B, Toh E, Fan B, et al. Bacterial Communities of the Coronal Sulcus and Distal Urethra of Adolescent Males. *PLoS ONE*. 2012; 7(5): e36298.

Nicolle LE. Catheter-related urinary tract infection. *Drugs Aging*. 2005;22: p. 627–639.

NIH Human Microbiome Portfolio Analysis Team. A review of 10 years of human microbiome research activities at the US National Institutes of Health, Fiscal Years 2007-2016. *Microbiome*. 2019;7(1): p .31.

Ogdenovska S, Mukerjee C, Sanderson-Smith M, Moore KH, Mansfield KJ. Virulence Mechanisms of Common Uropathogens and Their Intracellular Localisation within Urothelial Cells. *Pathogens*. 2022; 11(8):p. 926.

Oros D, Cepnja M, Zucko J et al. Identification of pathogens from native urine samples by MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometry. *Clin Proteom*. 2020; 17: p. 25.

Ottman N, Smidt H, de Vos WM, Belzer C. The function of our microbiota: who is out there and what do they do?. *Front. Cell. Inf. Microbio*. 2012; 2: p.104.

Pearce MM, Hilt EE, Rosenfeld AB, Zilliox MJ, Thomas-White K, Fok C, Kliethermes S, Schreckenberger PC, Brubaker L, Gai X, Wolfe AJ. The female urinary microbiome: a comparison of women with and without urgency urinary incontinence. *MBio*. 2014; 5: p. e01283-14.

Pezzlo M. Laboratory Diagnosis of Urinary Tract Infections: Guidelines, Challenges and Innovations. *Clin Microb*. 2014; 36(12): p. 87-93.

Pérez-Carrasco V, Soriano-Lerma A, Soriano M, Gutiérrez-Fernández J y García-Salcedo JA. Urinary Microbiome: Yin and Yang of the Urinary Tract. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2021;11:617002.

Pohl HG, Groah SL, Pérez-Losada M, Ljungberg I, Sprague BM, Chandal N, Caldovic L, Hsieh M. The Urine Microbiome of Healthy Men and Women Differs by Urine Collection Method. *Int Neurourol J*. 2020;24(1):p.41-51.

Price TK, Dune T, Hilt EE, Thomas-White KJ, Kliethermes S, Brincat C, Brubaker L, Wolfe AJ, Mueller ER, Schreckenberger PC. The Clinical Urine Culture: Enhanced Techniques Improve Detection of Clinically Relevant Microorganisms. *J Clin Microbiol*. 2016; 4(5):p.1216-1222.

Price TK, Hilt EE, Thomas-White K, Mueller ER, Wolfe AJ y Brubaker L. The Urobiome of Continent Adult Women: A Cross-Sectional Study. *Int. J. Obstet. Gynaecol*. 2020; 127 (2): p. 193–201.

Reyes A, Haynes M, Hanson N, Angly FE, Heath AC, Rohwer F y Gordon JL. Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature*. 2010; 466: p. 334–338.

Roberts KB. 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*. 2011; 128(3): p. 595-610.

Robino L, Scavone P, Araújo L, Algorta G, Zunino P, Vignoli R. Detection of intracellular bacterial communities in a child with *Escherichia coli* urinary tract infection. *Pathog Dis*. 2013; 68: p. 78-81.

Robino L, García-Fulgueiras V, Araújo L, Algorta G, Pérez MC, Vignoli R.. Urinary tract infection in Uruguayan children: Aetiology, antimicrobial resistance and uropathogenic *Escherichia coli* virulotyping. *J Glob. Antimic. Resist*. 2014a. 2: p. 293-298.

Robino L, Scavone P, Araújo L, Algorta G, Zunino P, Pérez MC. Intracellular bacteria in the pathogenesis of *Escherichia coli* urinary tract infection in children. *Clin Infect Dis Dec*. 2014b. 59: p. e158-164.

Robino L, Sauto R, Morales C, Navarro N, González MJ, Cruz E, Neffa F, Zeballos J, Scavone P. Presence of intracellular bacterial communities in uroepithelial cells, a potential reservoir in symptomatic and non-symptomatic people. *BMC Infect Dis*. 2024; 24, p. 590.

Rosen DA, Hooton TM, Stamm WE, Humphrey PA, Hultgren SJ. Detection of intracellular bacterial communities in human urinary tract infection. *PLoS Med*. 2007; 4(12): p. 1949-1958.

Sarah SG & Deborah TH. Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance and the oxidative stress response. *Virulence*. 2013; 4(4): p. 273-283.

Scanlan PD & Marchesi JR. Micro-eukaryotic diversity of the human distal gut microbiota: qualitative assessment using culture-dependent and-independent analysis of faeces. *The ISME Journal*. 2008; 2: p. 1183-1193.

Schneeweiss J, Koch M, Umek, W. The human urinary microbiome and how it relates to urogynecology. *International urogynecology journal*. 2016; 27: p. 1307-1312.

Scholtens PA, Oozeer R, Martin R, Amor KB, Knol J. The early settlers: intestinal microbiology in early life. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2012;3: p. 425-447.

Seija V, Frantchez V, Pintos M, Bataglino MN, Torales M, Díaz A, Dufrechou C. Etiología de la infección urinaria de adquisición comunitaria y perfil de susceptibilidad de *Escherichia coli* a los principales agentes antimicrobianos. *Rev. Med. Urug*. 2010. 26: p. 14-24.

Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol*. 2016.14(8): e1002533.

Siddiqui H, Nederbragt AJ, Lagesen K et al. Assessing diversity of the female urine microbiota by high throughput sequencing of 16S rDNA amplicons. *BMC Microbiol*. 2011; 11: p. 244.

Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK y Viridi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front. Microbiol*. 2015; 6:791.

Sollid JUE, Furberg AS, Hanssen AM, Johannessen M. *Staphylococcus aureus*: Determinants of human carriage. *Infection, Genetics and Evolution*. 2014; 21: p. 531-541.

Stamm WE, Wagner KF, Amsel R, Alejandro ER, Turck M, Cuenta GW, Holmes KK. Causes of the Acute Urethral Syndrome in Women. N. inglés. *J. Med*. 1980; 303: p. 409-415.

Stamm WE. Recent developments in the diagnosis and treatment of urinary tract infections. *Western Journal of Medicine*. 1982; 137(3): p. 213.

Stamm WE & Hooton TM. Management of urinary tract infections in adults. *N Engl J Med*. 2000;61(3):p. 713-721.

Stamm WE, Norrby SR. Urinary tract infections: disease panorama and challenges. *J. Infect. Dis*. 2001; 183 (1): p. 1-4.

Tan CW & Chlebicki, MP. Maciej Piotr. Urinary tract infections in adults. *Singapore medical journal*. 2016; 57 (9): p. 485.

Thomas-White KJ, Hilt EE, Fok C, Pearce MM, Mueller ER, Kliethermes S, Jacobs K, Zilliox MJ, Brincat C, Price TK, Kuffel G, Schreckenberger P, Gai X, Brubaker L, Wolfe AJ. Incontinence medication response relates to the female urinary microbiota. *Int Urogynecol J*. 2016; 27(5):p. 723-733.

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. 2018; *Nat. Commun*. 9 (1), 1557.

Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature*. 2007; 449:p. 804-810.

Vaughan MH, Zemtsov GE, Dahl EM, et al. Concordance of urinary microbiota detected by 16S ribosomal RNA amplicon sequencing vs expanded quantitative urine culture. *Am J Obstet Gynecol*. 2022;227(5): p. 773–775.

Veron L, Mailler S, Girard V, Muller BH, L'Hostis G, Ducruix C, Lesenne A, Richez A, Rostaing H, Lanet V, Ghirardi S, van Belkum A, Mallard F. Rapid urine preparation prior to identification of uropathogens by MALDI-TOF MS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34(9): p. 1787-1795.

Watkins KE, Unnikrishnan M. Evasion of host defenses by intracellular *Staphylococcus aureus*. *Adv Appl Microbiol*. 2020; 112:p.105-141.

Wilson ML & Gaidó L. Laboratory diagnosis of urinary tract infections in adult patients. *Clinical infectious diseases*. 2004;38(8): p. 1150-1158.

Wojno KJ, Baunoch D, Luke N, et al. Multiplex PCR Based Urinary Tract Infection (UTI) Analysis Compared to Traditional Urine Culture in Identifying Significant Pathogens in Symptomatic Patients. *Urology* 2020;136: p.119–26.

Wolfe AJ, Toh E, Shibata N, Rong R, Kenton K, FitzGerald M, Mueller ER, Schreckenberger P, Dong Q, Nelson DE, Brubaker L. Evidence of Uncultivated Bacteria in the Adult Female Bladder. *J Clin Microbiol*. 2012;50 (4): p. 1376-1383.

Whiteside, S., Razvi, H., Dave, S. et al. The microbiome of the urinary tract-a role beyond infection. *Nat Rev Urol*. 2015;12: p. 81–90.

Yacouba A, Tidjani Alou M, Lagier JC, Dubourg G, Raoult D. Urinary microbiota and bladder cancer: A systematic review and a focus on uropathogens. *Semin Cancer Biol.* 2022;(3): p. 875-884.

ANEXOS

Anexo 1. Tabla de crecimiento de microorganismos en las técnicas de urocultivo

Se indica número de muestra (n=141, la muestra 84 fue descartada) y el crecimiento de microorganismos en cada técnica según la siguiente referencia:

REFERENCIAS	
	Muestras positivas UE
	Muestras positivas EQUIC
	Muestras positivas ambas

Nºmuestra	UE	EQUC	AMBAS
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			
29			
30			
31			
32			
33			
34			
35			
36			
37			
38			
39			
40			
41			
42			
43			
44			
45			

N°muestra	UE	EQUC	AMBAS	N°muestra	UE	EQUC	AMBAS
46				91			
47				92			
48				93			
49				94			
50				95			
51				96			
52				97			
53				98			
54				99			
55				100			
56				101			
57				102			
58				103			
59				104			
60				105			
61				106			
62				107			
63				108			
64				109			
65				110			
66				111			
67				112			
68				113			
69				114			
70				115			
71				116			
72				117			
73				118			
74				119			
75				120			
76				121			
77				122			
78				123			
79				124			
80				125			
81				126			
82				127			
83				128			
85				129			
86				130			
87				131			
88				132			
89				133			
90				134			
				135			
				136			
				137			
				138			
				139			
				140			
				141			
				142			

Anexo 2. Tabla de aislamientos y especies bacterianas identificadas en todos los individuos

SA: sin aislamiento

SC: microorganismos sin crecimiento

SI: microorganismos sin identificar;

Situación: 1-

Sanos/asintomáticos

y 0-Sintomáticos;

UE y EQUC

condiciones A, B y C,

Id: especies

identificadas

Nºmuestra	Situación	Aislamientos	Especies Id	UE Id 1	UE Id 2	EQUC A Id 1	EQUC A Id 2	EQUC A Id 3	EQUC A Id 4	EQUC B Id 1	EQUC B Id 2	EQUC B Id 3	EQUC C Id 1	EQUC C Id 2	EQUC C Id 3
1	1	4	2	<i>Micrococcus luteus</i>	SA	<i>Micrococcus luteus</i>	SA	SA	SA	SI	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	SA	SA	SA
2	1	7	4	<i>S. epidermidis</i>	<i>Bacillus anthracis</i>	SA	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	SA	<i>S. copris</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	SA	SA	SA
3	1	6	5	<i>S. copris</i>	SA	<i>S. comissus ureolytic</i>	<i>S. copris</i>	<i>Corynebacterium Jfeii</i>	<i>Corynebacterium coyi</i>	<i>S. haemolyticus</i>	SA	SA	SA	SA	SA
4	1	4	2	<i>S. haemolyticus</i>	SA	<i>S. haemolyticus</i>	SA	SA	SA	SI	<i>Corynebacterium spp</i>	SA	SA	SA	SA
5	1	4	2	<i>Morganella morganii</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>Morganella morganii</i>	<i>E. faecalis</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
6	1	7	5	<i>Corynebacterium aurii</i>	<i>S. lugdunensis</i>	<i>Corynebacterium aurii</i>	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>E. coli</i>	SA	SA	SA	SA	SA
7	0	8	5	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. condementi</i>	SA	SA	SA	SA
8	1	5	4	<i>S. copre</i>	SA	<i>S. copre</i>	<i>S. lugdunensis</i>	SA	SA	<i>S. copris</i>	<i>S. condementi</i>	SA	SA	SA	SA
9	1	2	1	<i>E. coli</i>	SA	<i>E. coli</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
10	1	0	0	SC	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
11	1	1	1	SC	SA	SA	SA	SA	SA	<i>S. haemolyticus</i>	SA	SA	SA	SA	SA
12	1	3	1	<i>S. agalactiae</i>	SA	<i>S. agalactiae</i>	SA	SA	SA	<i>S. agalactiae</i>	SA	SA	SA	SA	SA
13	1	0	0	SI	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
14	1	2	2	<i>S. hominis</i>	SA	SA	SA	SA	SA	<i>E. coli</i>	SA	SA	SA	SA	SA
15	1	3	3	SI	SA	SA	SA	SA	SA	<i>S. copris</i>	<i>Streptococcus oryngio</i>	<i>Weissella flava</i>	SA	SA	SA
16	1	7	4	<i>E. faecalis</i>	SA	<i>E. faecalis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	SA	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	SA	<i>E. faecalis</i>	SA	SA
17	1	7	5	<i>E. faecalis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	SA	SA	SA	SA	<i>Streptococcus oryngio</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	SA
18	1	2	1	<i>E. faecalis</i>	SA	<i>E. faecalis</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
19	1	6	4	<i>E. faecalis</i>	SA	<i>E. faecalis</i>	SA	SA	SA	<i>E. faecalis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Dermabacter hominis</i>	SA	SA
20	1	1	1	SC	SA	SA	SA	SA	SA	<i>S. haemolyticus</i>	SA	SA	SA	SA	SA
21	1	2	2	SC	SA	SA	SA	SA	SA	<i>Streptococcus parvus</i>	<i>S. epidermidis</i>	SA	SA	SA	SA
22	1	5	3	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	SA	SA	SA	SA	SA	<i>Streptococcus oryngio</i>	SA	SA
23	1	6	4	<i>E. coli</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>Fusobacterium</i>	<i>Comphyobacter</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA
24	1	3	2	<i>S. haemolyticus</i>	SA	<i>S. haemolyticus</i>	SA	SA	SA	<i>E. faecalis</i>	SA	SA	SA	SA	SA
25	1	3	3	SC	SA	SA	SA	SA	SA	<i>Pseudomonas citricitibacter</i>	<i>S. copris</i>	<i>S. epidermidis</i>	NI	SA	SA
26	1	3	2	<i>S. haemolyticus</i>	SA	<i>S. haemolyticus</i>	SA	SA	SA	<i>E. faecalis</i>	SA	SA	SA	SA	SA
27	1	5	3	<i>Bacillus vallismortis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>Bacillus spp</i>	<i>S. epidermidis</i>	SA	SA	<i>S. epidermidis</i>	SA	SA	SA	SA	SA
28	1	1	1	<i>E. coli</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
29	1	6	3	<i>E. coli</i>	<i>Oniella uretralis</i>	<i>Oniella uretralis</i>	<i>E. coli</i>	SA	SA	<i>Pseudomonas citricitibacter</i>	<i>E. coli</i>	SA	SA	SA	SA

Nºmuestra	Situación	Aislamientos	Especies id	UE. Id 1	UE. Id 2	EQUCA. Id 1	EQUCA. Id 2	EQUCA. Id 3	EQUCA. Id 4	EQUC B. Id 1	EQUC B. Id 2	EQUC B. Id 3	EQUC C. Id 1	EQUC C. Id 2	EQUC C. Id 3
30	1	6	3	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	SA	SA	<i>E. faecalis</i>	<i>S. lugdunensis</i>	SA	SA	SA	SA
31	1	0	0	SC	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
32	1	8	4	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. cohnii ureolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. sapidis</i>	<i>S. cohnii ureolyticus</i>	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. cohnii ureolyticus</i>	SA	SA	SA	SA
33	1	3	3	SC	SA	<i>S. warneri</i>	<i>S. epidermidis</i>	SA	SA	<i>Faecalium hominis</i>	SA	SA	SA	SA	SA
34	1	0	0	SC	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
35	1	4	4	SC	SA	<i>S. haemolyticus</i>	SA	SA	SA	<i>S. haemolyticus</i>	<i>Corynebacterium</i> spp	<i>Bacillus</i> spp	SA	SA	SA
36	1	5	3	SC	SA	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. epidermidis</i>	SA	SA	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecalis</i>	SA	<i>E. faecalis</i>	SA	SA
37	1	0	0	SC	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
38	0	0	0	SC	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
39	1	2	2	SC	SA	<i>P. mirabilis</i>	SA	SA	SA	<i>S. pettencoffii</i>	SA	SA	SA	SA	SA
40	1	1	1	SC	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	<i>Streptococcus oryngio</i>	SA	SA
41	1	5	2	<i>P. mirabilis</i>	SA	<i>P. mirabilis</i>	SA	SA	SA	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. coli</i>	SA	<i>E. coli</i>	SA	SA
42	0	3	1	<i>E. coli</i>	SA	<i>E. coli</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA	<i>E. coli</i>	SA	SA
43	1	3	2	<i>S. haemolyticus</i>	SA	<i>S. haemolyticus</i>	<i>Arctobacter</i> spp	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
44	1	2	2	SC	SA	<i>Arctobacter</i> spp	SA	SA	SA	SA	SA	SA	<i>Streptococcus oryngio</i>	SA	SA
45	1	5	4	<i>Acinetobacter</i> novj	<i>S. haemolyticus</i>	SA	<i>S. haemolyticus</i>	SA	SA	<i>Enterobacterium</i> spp	<i>P. mirabilis</i>	SA	SA	SA	SA
46	1	2	1	<i>S. haemolyticus</i>	SA	<i>S. haemolyticus</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
47	1	6	4	<i>S. haemolyticus</i>	SA	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. epidermidis</i>	SA	SA	<i>Streptococcus sanguis</i>	<i>E. cloacae</i>	SA	<i>S. epidermidis</i>	SA	SA
48	1	4	3	SC	SA	SA	SA	SA	SA	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	SA	SA
49	1	2	1	<i>P. mirabilis</i>	SA	<i>P. mirabilis</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
50	1	4	3	<i>P. mirabilis</i>	SA	<i>P. mirabilis</i>	SA	SA	SA	<i>Streptococcus oryngio</i>	<i>S. epidermidis</i>	SA	SA	SA	SA
51	1	7	4	<i>P. mirabilis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>S. epidermidis</i>	SA	SA	<i>S. epidermidis</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	SA	<i>Streptococcus conste</i>	SA	SA
52	1	9	3	<i>S. haemolyticus</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	SA	<i>S. haemolyticus</i>	<i>E. coli</i>	SA	<i>S. haemolyticus</i>	<i>E. coli</i>	SA
53	1	2	2	SC	SA	<i>S. haemolyticus</i>	SA	SA	SA	<i>E. coli</i>	SA	SA	SA	SA	SA
54	1	7	3	<i>E. faecalis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	SA	SA	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	SA	SA	<i>E. faecalis</i>	SA
55	1	4	1	<i>E. coli</i>	SA	<i>E. coli</i>	SA	SA	SA	<i>E. coli</i>	SA	SA	<i>E. coli</i>	SA	SA
56	1	1	1	SC	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	<i>E. faecalis</i>	SA	SA
57	1	6	5	SC	SA	<i>E. coli</i>	<i>S. posteri</i>	<i>Bacillus</i> flexus	<i>S. lugdunensis</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	SA	SA	SA	SA
58	1	1	1	SC	SA	<i>S. haemolyticus</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
59	1	0	0	SC	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
60	1	8	4	<i>S. haemolyticus</i>	<i>Weissella marocae</i>	<i>Weissella marocae</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Routella</i> spp	SA	SA	SA	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. coli</i>	SA

Nmuestra	Situación	Aislamientos	Especies id	UE. Id 1	UE. Id 2	EQUC A. Id 1	EQUC A. Id 2	EQUC A. Id 3	EQUC A. Id 4	EQUC B. Id 1	EQUC B. Id 2	EQUC B. Id 3	EQUC C. Id 1	EQUC C. Id 2	EQUC C. Id 3
61	1	8	5	<i>P. vulgaris</i>	<i>C. faecii</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>C. faecii</i>	<i>S. haemolyticus</i>	SA	<i>E. faecalis</i>	<i>Morganella morganii</i>	SA	<i>E. faecalis</i>	SA	SA
62	1	4	2	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. hominis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. hominis</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
63	1	4	3	<i>Paenibacillus spp</i>	SA	<i>Paenibacillus spp</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. confimenti</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
64	0	2	1	<i>E. coli</i>	SA	<i>E. coli</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
65	1	4	3	<i>E. faecalis</i>	SA	<i>E. faecalis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
66	1	1	1	SC	SA	<i>E. faecalis</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
67	0	1	1	SC	SA	<i>E. faecalis</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
68	0	1	1	SC	SA	<i>S. haemolyticus</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
69	0	0	0	SC	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
70	0	1	1	SC	SA	<i>S. haemolyticus</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
71	1	0	0	SI	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
72	1	0	0	SI	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
73	0	1	1	SC	SA	<i>E. faecalis</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
74	0	2	1	<i>Bacillus subtilis</i>	SA	<i>Bacillus subtilis</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
75	0	2	1	<i>S. agalactiae</i>	SA	<i>S. agalactiae</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
76	1	3	2	<i>S. epidermidis</i>	SA	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecalis</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
77	1	0	0	SC	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
78	0	4	3	<i>Agrobacter radiobacteris</i>	SA	<i>E. coli</i>	<i>erobacter radiobacteris</i>	<i>K. pneumoniae</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
79	0	1	1	SC	SA	<i>S. motophilla</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
80	0	0	0	SC	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
81	0	1	1	SC	SA	<i>E. faecalis</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
82	1	0	0	SC	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
83	0	2	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SA	<i>seudomonas aeruginosa</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
85	0	2	2	SC	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	<i>E. faecalis</i>	<i>Comorbacterium aur</i>	SA	SA
86	0	0	0	SC	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
87	0	2	2	SC	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	<i>ocillus mequeturum</i>	<i>Veillonella dentitoni</i>	SA	SA
88	0	7	3	<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>	SA	SA	SA	SA	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	SA	SA
89	0	5	5	SC	SA	<i>E. faecalis</i>	SA	SA	SA	<i>S. epidermidis</i>	<i>Rourelia Oritinol</i>	SA	<i>Rourelia spp</i>	<i>E. coli</i>	SA
90	0	0	0	SC	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA

Nºmuestra	Situación	Aislamientos	Especies Id	UE. Id 1	UE. Id 2	EQUCA. Id 1	EQUCA. Id 2	EQUCA. Id 3	EQUCA. Id 4	EQUC B. Id 1	EQUC B. Id 2	EQUC B. Id 3	EQUC C. Id 1	EQUC C. Id 2	EQUC C. Id 3
91	0	5	3	<i>E. coli</i>	SA	<i>E. coli</i>	SA	SA	SA	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Corynebacterium coli</i>	SA	<i>E. coli</i>	SA	SA
92	0	6	2	<i>K. variicola</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. variicola</i>	<i>K. pneumoniae</i>	SA	SA	<i>K. pneumoniae</i>	SA	SA	<i>K. pneumoniae</i>	SA	SA
93	0	2	1	<i>E. coli</i>	SA	<i>E. coli</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
94	1	1	1	<i>S. epidermidis</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
95	1	0	0	SC	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
96	0	3	2	<i>S. haemolyticus</i>	SA	<i>S. haemolyticus</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA	<i>Lactobacillus ferment</i>	SA	SA
97	0	0	0	SC	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
98	0	5	3	SC	SA	SA	SA	SA	SA	<i>E. faecalis</i>	<i>S. oris</i>	SA	<i>E. faecalis</i>	<i>S. oris</i>	<i>Pseudomonas oris</i>
99	0	4	2	<i>K. pneumoniae</i>	SA	<i>K. pneumoniae</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. oris</i>	SA
100	0	6	4	<i>K. pneumoniae</i>	SA	<i>K. pneumoniae</i>	SA	SA	SA	<i>K. pneumoniae</i>	SA	SA	<i>P. hauseri</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>
101	0	7	4	<i>M. morganii</i>	<i>E. coli</i>	<i>M. morganii</i>	<i>E. coli</i>	SA	SA	<i>P. mirabilis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	SA	<i>M. morganii</i>	SA	SA
102	0	3	1	<i>P. mirabilis</i>	SA	<i>P. mirabilis</i>	SA	SA	SA	<i>P. mirabilis</i>	SA	SA	SA	SA	SA
103	0	5	2	<i>E. coli</i>	SA	<i>E. coli</i>	SA	SA	SA	<i>E. coli</i>	SA	SA	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	SA
104	0	5	2	<i>E. coli</i>	SA	<i>E. coli</i>	SA	SA	SA	<i>E. coli</i>	SA	SA	<i>E. coli</i>	<i>Bifidobacterium long</i>	SA
105	0	7	3	<i>E. coli</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. mirabilis</i>	SA	SA	<i>E. coli</i>	<i>P. mirabilis</i>	SA	<i>E. coli</i>	SA	SA
106	0	6	5	<i>S. capitis</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. capitis</i>	<i>S. agalactiae</i>	SA	SA	<i>E. faecalis</i>	SA	SA	<i>Peptonifilius hauseri</i>	SA	SA
107	0	4	1	<i>E. coli</i>	SA	<i>E. coli</i>	SA	SA	SA	<i>E. coli</i>	SA	SA	<i>E. coli</i>	SA	SA
108	0	4	2	<i>P. mirabilis</i>	SA	<i>P. mirabilis</i>	SA	SA	SA	<i>E. coli</i>	SA	SA	<i>E. coli</i>	SA	SA
109	0	4	2	<i>E. cloacae</i>	SA	<i>E. cloacae</i>	SA	SA	SA	<i>E. coli</i>	SA	SA	<i>E. coli</i>	SA	SA
110	0	3	1	<i>K. pneumoniae</i>	SA	<i>K. pneumoniae</i>	SA	SA	SA	<i>K. pneumoniae</i>	SA	SA	SA	SA	SA
111	0	2	1	<i>E. coli</i>	SA	<i>E. coli</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
112	0	3	1	<i>E. coli</i>	SA	<i>E. coli</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA	<i>E. coli</i>	SA	SA
113	0	2	1	<i>K. pneumoniae</i>	SA	<i>K. pneumoniae</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
114	0	4	3	<i>E. coli</i>	SA	<i>E. coli</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA	<i>Lactobacillus saliv</i>	<i>S. hauseri</i>	SA
115	0	2	1	<i>E. coli</i>	SA	<i>E. coli</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
116	0	3	1	<i>E. coli</i>	SA	<i>E. coli</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA	<i>E. coli</i>	SA	SA
117	0	7	3	<i>S. simulans</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. simulans</i>	<i>E. coli</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	SA	<i>E. coli</i>	SA	SA	<i>E. coli</i>	SA	SA
118	0	4	2	<i>P. mirabilis</i>	SA	<i>P. mirabilis</i>	SA	SA	SA	<i>P. mirabilis</i>	SA	SA	<i>Lactobacillus johnso</i>	SA	SA
119	0	3	2	<i>E. coli</i>	SA	<i>E. coli</i>	SA	SA	SA	<i>Lactobacillus saliv</i>	SA	SA	SA	SA	SA

Nº muestra	Situación	Aislamientos	Especies id	UE. Id 1	UE. Id 2	EQUC A. Id 1	EQUC A. Id 2	EQUC A. Id 3	EQUC A. Id 4	EQUC B. Id 1	EQUC B. Id 2	EQUC B. Id 3	EQUC C. Id 1	EQUC C. Id 2	EQUC C. Id 3
120	0	2	1	E. coli	SA	E. coli	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
121	0	4	2	E. coli	SA	E. coli	SA	SA	SA	SA	SA	SA	E. coli	Lactobacillus reuteri	SA
122	0	4	2	S. saprophyticus	SA	S. saprophyticus	SA	SA	SA	SA	SA	SA	S. saprophyticus	L. crispatus	SA
123	0	0	0	SC	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
124	0	4	2	P. mirabilis	SA	P. mirabilis	SA	SA	SA	SA	SA	SA	P. mirabilis	L. vaginalis	SA
125	0	2	1	E. coli	SA	E. coli	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
126	0	5	3	E. coli	Weissella virosa	E. coli	Weissella virosa	Organello urethralis	SA	SA	SA	SA	NI	SA	SA
127	0	3	1	E. coli	SA	E. coli	SA	SA	SA	E. coli	SA	SA	SA	SA	SA
128	0	5	2	E. coli	SA	E. coli	SA	SA	SA	E. coli	SA	SA	E. faecalis	E. coli	SA
129	0	3	1	P. mirabilis	SA	P. mirabilis	SA	SA	SA	SA	SA	SA	P. mirabilis	SA	SA
130	0	6	3	E. coli	E. faecalis	E. coli	E. faecalis	SA	SA	SA	SA	SA	E. coli	L. crispatus	SA
131	0	3	3	E. coli	SA	E. coli	SA	SA	SA	SA	SA	SA	Actinomyces israelii	SA	SA
132	1	1	1	S. haemolyticus	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
133	0	0	0	SI	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
134	0	5	3	S. lugdunensis	E. faecalis	S. lugdunensis	E. faecalis	SA	SA	S. gallitricus	SA	SA	SA	SA	SA
135	1	4	3	S. haemolyticus	SA	S. haemolyticus	SA	SA	SA	SA	SA	SA	L. jensenii	S. epidermidis	SA
136	0	2	1	E. coli	SA	E. coli	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
137	0	1	1	E. coli	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
138	0	1	1	E. coli	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
139	1	0	0	SC	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
140	0	0	0	SC	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
141	0	4	2	E. coli	Micrococcus luteus	E. coli	Micrococcus luteus	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
142	0	2	1	E. coli	SA	E. coli	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA