

---

---

# Dos nuevas técnicas manuales rápidas para antibiogramas urinarios en 6 a 18 horas

Margaret Ordóñez Smith de Danies\*

## RESUMEN

Se estudiaron 694 muestras de orina de las cuales 130 sirvieron para estudiar dos nuevas técnicas manuales para antibiogramas urinarios con orinas de recuentos bacterianos >100.000 UCF/mL. Una se denomina NUEVA TECNICA DIRECTA, y se interpreta después de 6 a 18 horas de recolectada la muestra de orina, teniendo una confiabilidad del 99%. La segunda técnica se titula TECNICA DE ENRIQUECIMIENTO cuyo resultado se da entre 10 a 22 horas con una confiabilidad del 99% ( $p > 0.900$ ) en relación con las lecturas de la técnica estándar de difusión en disco. Con las nuevas técnicas no es necesario esperar al aislamiento bacteriano.

## 1. INTRODUCCION

Hasta donde llega mi conocimiento es la primera vez que se describen estas nuevas técnicas manuales para antibiogramas urinarios (se realizaron dos para escoger la mejor) y obtener su informe rápido (6 a 18 horas). Al comparar las nuevas técnicas descritas con la técnica estándar de difusión en disco se ahorran de 30 a 40 horas, y el costo del cultivo para el aislamiento bacteriano. Las técnicas que propongo están al alcance económico de todo laboratorio, en especial para los países en donde no tengan equipos sistematizados, por su alto costo. Estas nuevas técnicas son totalmente manuales y además para el paciente tienen la ventaja de que le formulan pronto y a ciencia cierta el antibiótico más eficaz. Nuestras nuevas técnicas sólo se pueden aplicar para recuentos >100.000 UCF/mL, aunque hoy en día los criterios de infección urinaria no son de recuentos tan altos (1, 2, 3, 4, 5).

## 2. MATERIAL Y METODOS

### 2.1. Pacientes

Se procesaron muestras de orina tomadas por el paciente o llevadas al laboratorio (consulta externa). A cada persona se le realizó un resumen de su

historia clínica para saber si tenían alguna sintomatología de infección urinaria, y/o saber si el paciente estaba tomando alguna droga antimicrobiana.

### 2.2. Muestras de orina

Todas las muestras se procesaron antes de 2 horas de su recolección (1, 6, 7), y se les practicó a todas el recuento bacteriano y el examen parcial de orina (8, 9, 10, 11, 12). Para la toma de muestras se recomendó a los pacientes lavarse muy bien los genitales externos y tomar la muestra a mitad de micción (8). No se le indicó baño especial con antiséptico (6, 13), pues se ha comprobado que pueden quedar residuos e inhibir el crecimiento bacteriano. Los frascos donde se recogió la muestra eran estériles, sin ningún líquido preservativo (6, 14). Las muestras de orina no siempre fueron de la primera micción del día.

### 2.3. Control de calidad

Los medios de cultivo utilizados fueron importados y se les realizó su control de calidad bacteriológico y de esterilidad. Igualmente los sensibilizadores fueron utilizados bajo la FDA (Food and Drug Administration) e importados. (15, 16).

### 2.4. Siembra para la cuantificación del urocultivo

Todas las muestras (694 casos) se procesaron de la siguiente manera: para saber su cuantificación se sembraron con asa de 0.01 mL en agar sangre, agar MacConkey, de acuerdo con los métodos estandarizados (1, 6, 8) y además personalmente incluí en la siembra primaria la inoculación en agar CLED (con indicador de Andrade) para el crecimiento de levaduras y detectar cultivos mixtos (17). Se incubaron los cultivos 37°C por 24 horas o 48 horas y en los casos sintomáticos se dejaron hasta tres días.

### 2.5. Técnica estándar de difusión en disco

#### 2.5.1. Siembra de la muestra, recuento e identificación

Para poder aplicar la técnica de sensibilidad antimicrobiana estándar es preciso aislar la bacteria.

---

\* Directora Científica del Instituto de Microbiología, Apartado 93.151, Bogotá 8, Col.

---

Al segundo día se realiza el recuento de colonias e identificación de las bacterias. Cultivos con dos colonias se aislaron la que tenga mayor cuantificación y si tenían tres colonias diferentes se deben descartar y pedir nueva muestra.

### **2.5.2. Antibiograma estándar**

Se realiza en el segundo día, de acuerdo con lo descrito por Bauer y modificado por el NCCLS (Comité Nacional de Estándares de Laboratorio de Estados Unidos) (18, 19, 20, 21). Como varios autores han estudiado otros medios de cultivo (22, 23), lo único diferente de nuestro análisis estándar fue que se realizaron en agar Iso-Sensitest y no en agar Mueller Hinton (Figura 1).

### **2.5.3. Interpretación del antibiograma (tercer día)**

La lectura se hace exactamente a las 18 horas de su incubación y se interpreta según la zona de inhibición, o sea midiendo el diámetro con una reglilla milimétrica la zona o el halo de inhibición, o sea lo que no creció alrededor del sensidisco (18, 19, 10, 21). Las zonas de inhibición se pueden hacer a las 6 horas (24) para obtener una primera lectura.

### **2.6. Nueva técnica directa**

Propongo esta nueva técnica para casos graves, agudos o sea para orina que tenga incontables bacterias en su parcial de orina o cuatro cruces, o cuando una muestra llegue tarde al laboratorio y no sea posible procesarla como se enuncia en el numeral 2.7 (figura 1).

#### **2.6.1. Antibiograma con la nueva técnica directa**

El método se realizó de la siguiente manera: se tomaron directamente de la orina 2 asas con asa calibrada de 0.01 mL, y se inocularon en agar Iso-Sensitest. Se sembró en forma masiva con un escobillón estéril y en seguida se colocaron los mismos sensidiscos que se utilizaron en la técnica de enriquecimiento como en la técnica estándar. Se incubó la caja de agar Iso-Sensitest a 37°C durante 18 horas.

#### **2.6.2. Interpretación de la técnica directa (segundo día)**

Se lee como en la técnica estándar (2.5.3.) y se reporta el diámetro, cuando se observó bacterias en

la zona de inhibición se realizó un Gram y si tenía la misma morfología de la bacteria homogénea se informaba como resistente. En la mayoría de los casos que hubo cultivos mixtos fueron por bacterias saprofíticas tales como difteroides o *Staphylococcus epidermidis*.

### **2.7. Nueva técnica de enriquecimiento**

Para tecnificar este método se realizó primero la estandarización del inóculo en el caldo triptona soya para procesar el antibiograma (ver 3.1). Se observaron los cultivos con diferentes tiempos de incubación: 2, 3 y 4 horas. Se utilizaron a la vez las mismas orinas del numeral 2.6. (Figura 1).

Estos inóculos se obtuvieron sembrando 2 asas o sea 0.02 mL de orina en 2 mL del caldo triptona soya en tres diferentes tubos: un tubo se dejó por dos horas, el otro tres horas y el otro tubo por cuatro horas. Cuando estos caldos se dejaron por 6 o más horas, hubo un sobrecrecimiento; por ello no se recomienda incubar más de 4 horas.

#### **2.7.1. Antibiograma de la nueva técnica de enriquecimiento**

Se dejan los tres tubos de caldo triptona soya con orina durante el tiempo de incubación estudiado (2, 3, 4 horas); se le hace el antibiograma en el agar Iso-Sensitest como el de la técnica estándar, colocándole los mismos sensidiscos de los numerales 2.5. y 2.6.

#### **2.7.2. Interpretación de la nueva técnica de enriquecimiento (segundo día).**

Se interpreta como en el numeral 2.6.2.

### **2.8. Programa del computador para conocer las diferencias entre las nuevas técnicas y las estándar**

Por los altos costos no se realizaron en todos los casos las dos nuevas técnicas. De las 694 muestras de orina se encontraron 216 muestras con bacteriuria incontable en el parcial de orina. A éstas se les procesaron las nuevas técnicas, y de estos casos 130 crecieron bien para hacer nuestros análisis estadísticos. En un cuadro se transcribieron las tres lecturas de los diámetros de las zonas de inhibición obtenidos en las pruebas de sensibilidad: directa, enriquecimiento y estándar. Con la nueva técnica de enriquecimiento fue necesario estudiar tres grupos por las diferentes horas de

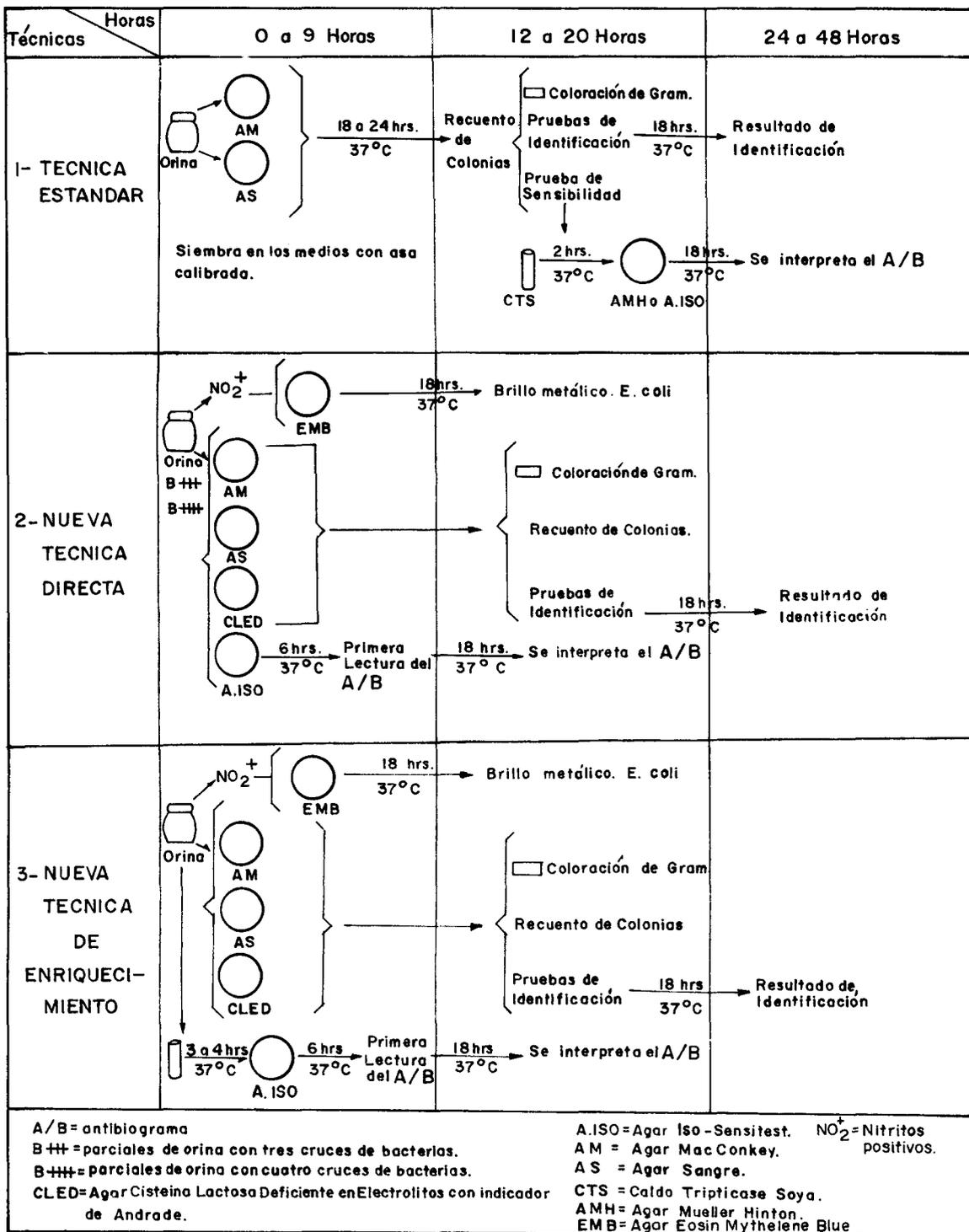


Figura 1. Comparación de las tres (3) técnicas de Antibiogramas.

incubación. Se desarrolló un programa en d-base para obtener las diferencias entre la directa y la estándar y la diferencia entre la de enriquecimiento y la estándar, y la droga antimicrobiana empleada.

### 2.9. Análisis estadísticos

Se realizó el chi-cuadrado (25), se compararon las dos nuevas técnicas y la técnica estándar.

### 3. RESULTADOS

Se procesaron 694 muestras de orina, que se dividieron en 4 grupos: las orinas cuyos recuentos fueron >100.000 UCF/mL (216 casos), de 10.000 a 90.000 UCF/mL (107) casos de <10.000 UCF/mL (278 casos) y 93 del grupo control o "sano" para saber si en los caldos se podía presentar un análisis "falso positivo". Los casos en relación con las edades con infecciones >100.000 UCF/mL fueron: en mujeres de 1 a 10 años 3% (5 casos), entre 20 y 39 años 33%, entre 40 a 59 años 27% y mayores de 60 años 37% (69 de 187). Con respecto a los hombres hubo en total 16 casos, 3 fueron en niños menores de 1 año, 1 caso de 10 a 19 años, 1 de 20 a 39 años, 9 de 40 a 59 años y 2 casos de pacientes mayores de 60 años.

#### 3.1. Estandarización del inóculo para antibiogramas con la nueva técnica de enriquecimiento

Inicialmente se comparó el caldo Schaedler con el caldo triptona soya. Incubando orina con caldo triptona soya por varias horas se obtuvieron antibiogramas similares al inóculo de la escala de McFarland obtenidos con la técnica estándar. Con el caldo triptona soya, a las 2 horas dio cuantificaciones similares en un 70.4% (69 de 98) y con el caldo Schaedler del 66.6% (70 de 105), con el caldo triptona soya a las 3 horas de incubación dio 80% (124 de 155) y a las 4 horas 92% (46 de 50).

#### 3.2. Comparación de las dos nuevas técnicas con la estándar

Del primer grupo (>100.000 UCF/mL) se analizaron 216 casos, de los cuales 130 muestras sirvieron para compararlas con la técnica estándar, pues no en todos los casos hubo crecimiento bacteriano en los antibiogramas de las nuevas técnicas. Por lo general las lecturas de los halos de inhibición siempre dieron mayores a los de la técnica estándar. (Figura 2).

Se analizó por separado cada antibiótico, pues observamos que no todos se comportan de igual manera. En todos los casos se obtuvo una confiabilidad del 99% (un chi-cuadrado de  $p > 0.900$ ) pues entre las nuevas técnicas y la estándar no hay diferencia. Con la técnica directa se obtuvieron zonas de inhibición en promedio de 2 a 4 mm mayores que con la estándar, y con la nueva técnica de enriquecimiento entre 1 a 2 mm (Figura 2). Los

diámetros más cercanos a los de la técnica estándar fueron con la nueva técnica de enriquecimiento con 4 horas de incubación.

Con orinas de 3 cruces de bacterias en el parcial de orina se obtuvo crecimiento pero el antibiograma no da un inóculo uniforme y por lo tanto no se puede interpretar.

### 4. DISCUSION

El objeto de tener resultados rápidos es: primero, darle al médico una información lo más pronto posible para que pueda formular el medicamento preciso; segundo, evitar la resistencia bacteriana por el uso indiscriminado de antibióticos (26); tercero, disminuir costos al laboratorio para que no se procesen orinas para los recuentos de colonias; cuarto, reducir gastos al paciente evitándole comprar drogas que no tienen eficacia terapéutica (26, 27), en cambio con las nuevas técnicas se descartan en 6 horas cuando una droga no sirve; quinto, con nuestras nuevas técnicas podemos informar el antibiograma en casos urgentes a las 6 horas (24) para la directa o con la de enriquecimiento a las 8, 10, 12 o a las 22 horas.

Las técnicas que propongo son prácticas para los casos agudos o sea cuando es más necesario saber el antimicrobiano más eficaz. Ninguna técnica manual se acerca tanto como la descrita en nuestra investigación, pues las técnicas de otros autores dan un 63% (28), un 65% (29), y un 77% (30) de confiabilidad y aún las técnicas semiautomatizadas dan 77% de correlación, como los sistemas automatizados, Autobac, que dan un 93% pero requieren de aislamiento bacteriano (31,32).

El comité de Estados Unidos NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (21) recomienda el agar Mueller Hinton, pero otros autores en Europa (22, 23, 33) trabajan la técnica de difusión en disco con agar Diagnostic Sensitivity test, agar Sensitest o agar Iso-Sensitest, porque el agar Mueller Hinton presenta variabilidad entre lote y lote (21). Personalmente hemos observado una mayor nitidez en las lecturas con el agar Iso-Sensitest, y por ello hicimos nuestro trabajo con este medio, ya que no hay diferencias en sus halos de inhibición.

En conclusión, la técnica que recomiendo para emplear en los casos de orina con bacterias Gram negativas, incontables, y nitritos positivos en el

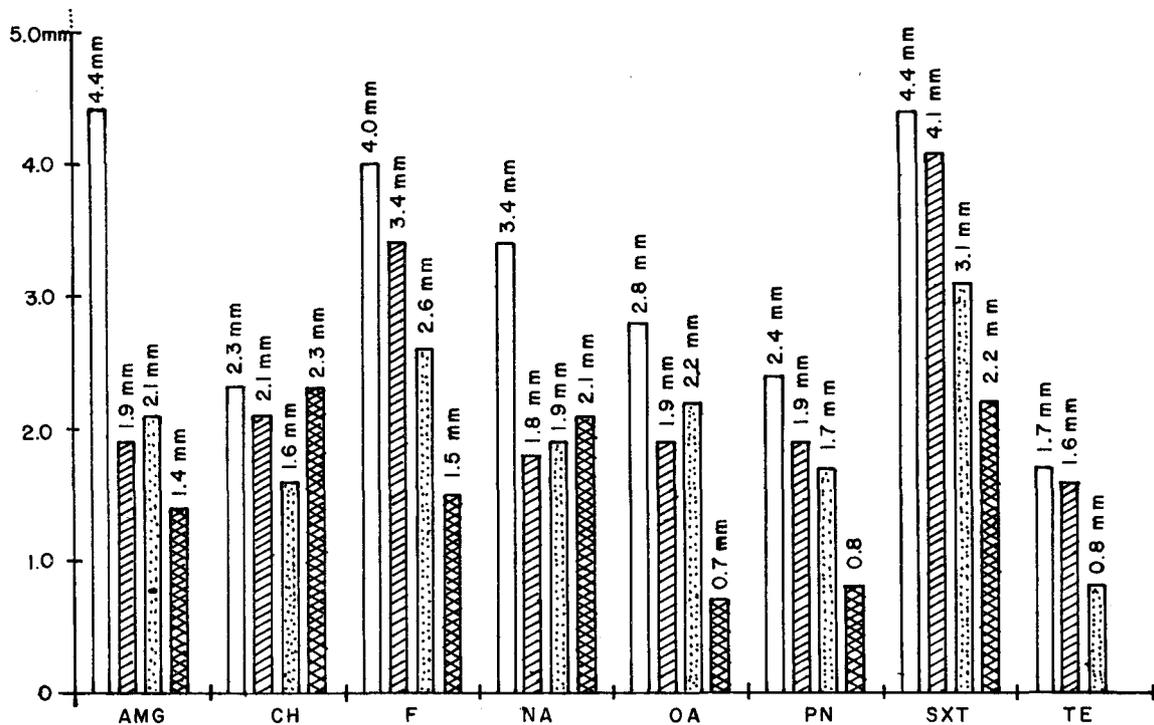


Figura . 2 .  
Diferencia en milímetros de las lecturas de las zonas de inhibición de las Nuevas Técnicas comparadas con la Técnica Estándar. ( $p \leq 0.001$ )

  
 Nueva Técnica  
 Directa

2 Horas



3 Horas



4 Horas



Incubación a 37°C en CTS (Caldo Tripticase Soya)  
Con la Nueva Técnica de Enriquecimiento.

AMG = Aminoglucósidos  
 CH = Cefradina, Cefalotina y Cefalexina  
 F = Nitrofurantoina  
 NA = Acido Nalidíxico  
 OA = Acido Oxolínico  
 PN = Ampicilinas y Amoxicilina  
 SXT = Sulfa-trimetropin  
 TE = Tetraciclina

Figura 2

parcial de orina es, en especial, la nueva técnica de enriquecimiento con 4 horas de incubación. Se puede reportar el mismo día o al día siguiente. En el caso de un antibiograma con la nueva técnica directa, cuando utilizamos una cefradina y la zona es de 20 mm (sería por el método estándar "sensible") (15), pero por la directa es mejor interpretarla

como un halo de 16 mm o sea "intermedio", pues Barlett recomienda hacer errores "menores" y no "mayores" (16). Estas nuevas técnicas no se aplican para bacterias Gram positivas tales como *Listeria*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y en algunos casos *Staphylococcus* aunque haya un recuento  $>100.000$  UCF/mL.

## 5. AGRADECIMIENTOS.

A mi padre, el cardiólogo y profesor J. Hernando Ordóñez por todas sus valiosas observaciones; y a mi esposo Gustavo Danies Silva por el desarrollo de los programas de computador.

## 6. REFERENCIAS.

1. PEZZLO, M. T., WETKOWSKI, M., PETERSON, E., and MAZA, L. Detection of bacteria and pyuria within two minutes. *J. Clin. Microbiol.* 21(4):578-581, 1985.
2. BIXLER-FORELL, E., BERTRAM, M., and BRUCKNER, D. Clinical evaluation of three rapid methods for the detection of significant bacteriuria. *J. Clin. Microbiol.* 22(1):62-67, 1985.
3. LATHAM, R., RUNNING, K., and STAMM, W. E. Urinary tract infections in young adult women by caused by *Staphylococcus saprophyticus*. *JAMA.* 250(22):3063-3066, 1983.
4. STAMM, W. E. Diagnosis of coliform infection in acutely dysuric women. *N. Engl. J. Med.* 307: 463-468, 1982.
5. BERG, A. O., HEIDRICJ, F. E., FIHN, S. D., BERGMAN, J. J., WOOD, R. W., STAMM, W. E., and HOLMES, K. K. Establishing the cause of genitourinary symptoms in women in a family practice. *JAMA.* 251(5):620-625, 1984.
6. WEINSTEIN, M. P. Evaluation of liquid and lyophilized preservatives for urine culture. *J. Clin. Microbiol.* 18(4): 912-916, 1983.
7. TRAUB, W.H., SPORHR, M., ARNOLD, M., and KLOTZ, M. Bactericidal activity of antimicrobial drugs in simulated urine specimens at various temperatures of incubation. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. [A]* 255(4): 494-502, 1983.
8. KOMAROFF, A. L. Urinalysis and urine culture in women with dysuria. *Annals of Internal Medicine.* 104: 212-218, 1986.
9. LIPPMAN, R. W. Examen de orina y su interpretación. 3a. ed. Salvat Ed. Barcelona. p. 3-54, 1982.
10. KAMOUN, P., y FREJAVILLE, J. P. Guía de exámenes de laboratorio. Salvat Editores, Barcelona, p. 53-56, 1981.
11. SHAW, S. T., SELINA, Y. P., and WONG, E. T. Routine urinalysis. Is the dipstick enough? *JAMA.* 11(253): 1596-1600, 1985.
12. SZWED, J. J., and SCHAUST, C. The importance of microscopic examination of the urinary sediment. *Am. J. Med. Technol.* 48(2): 141-143, 1982.
13. CHOU, S., and MERIGAN, T.C. Rapid detection and quantitation of human citomegalovirus in urine through DNA hybridization. *N. Engl. J. Med.* 308(16): 921-925, 1983.
14. NICHANDER, K. K., SANHOLTZER, C. J., and PETERSON, L. R. Urine culture transport tubes: effect of a sample volume on bacterial toxicity of the preservative. *J. Clin. Microbiol.* 15(4): 593-595, 1982.
15. KONEMAN, E. W., ALLEN, S. D., DOWELL, Jr., V. R., and SOMMERS, H. M. *Diagnostic Microbiology*, J. B. Lippincott Company. Philadelphia, 3-244, 1979.
16. BARLETT, R. C., et al. *Clinical Microbiology. Quality Assurance in Clinical Microbiology.* 16 U.S. Department of Health Education, and Welfare Public. Health Service, U. S. A. 926-936, 1978.
17. TANNER, E., and BULLIN, C. Thymidine-dependent *Escherichia coli* infection and some associated laboratory problems. *J. Clin. Path.* 27:565-568, 1974.
18. BAUER, A. W., KIRBY, M. M., SHERRIS, J. C., and TRUCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45(4): 493-496, 1966.
19. METZLER, C. M., and DeHAAN, R. M. Susceptibility test of anaerobic bacteria statistical and clinical considerations. *J. Infect. Dis.* 130(63): 588-594, 1974.
20. ORDOÑEZ SMITH, M. Generalidades de las pruebas de susceptibilidad a agentes antimicrobianos y su control de calidad. *Memorias del I Simposio Internacional de Microbiología Clínica.* Bogotá, p. 1-32, 1983.
21. Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico NCCLS. Estándares para las pruebas de susceptibilidad en discos antimicrobianos/ pruebas de susceptibilidad. 3a. ed. Vol. 4 No. 16:1-24, 1984.
22. SNELL, J. J. S., BROWN, D. F., and GARDNER, P. S. Comparison of results from two antibiotic susceptibility testing trials that formed part of the United Kingdom national external quality assessment scheme. *J. Clin. Pathol.* 37:321-328, 1984.
23. RELLER, L. B., SCHOENKNECHT, D, KENNY, M. A., and SHERRIS, J. C. Antibiotic susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa*: Selection of a control strain formagnesium and calcium content in media. *J. Infect. Dis.* 130:454-463, 1974.
24. WADKE, M., McDONNELL, C., and ASHTON, J. K. Rapid processing of urine specimens by urine screening and automicrobic systems. *J. Clin. Microbiol.* 16(4): 668-672, 1982.
25. PARKER, R. E. *Estadística para Biólogos.* Ediciones Omega. Barcelona. p. 48-52, 1976.

26. ALVAREZ MESTRA, R. Combinación de antimicrobianos. *Tribuna Médica. Colombia* 854. Tomo LXXIII (2): 25-27, 1986.
27. PFALLER, M., and KOONTZ, F. Use of rapid screening tests in processing urine specimens by conventional culture and Automicrobic System. *J. Clin. Microbiol.* 21(5): 783-787, 1985.
28. BARRY, A. L., JOYCE, L. J., ADAMS, A. P., and BRENNER, C. J. Rapid determination of antimicrobial susceptibility for urgent clinical situations. *Am. J. Clin. Pathol.* 59: 693-699, 1973.
29. ROSSIGNOL, D., BARTHEZ, J. P., et SOUESME, J. Antibiogramme urinaire direct. *La Nouvelle Presse Médicale*, 8(39): 3127-3129, 1979.
30. PERRIN, P., GILLE, Y., DURAND, L., et VICENT, P. L'infection urinaire en urologie. *Journal d'Urologie et de Nephrologie.* No. 7-8: 499-507, 1977.
31. BINFORD, J., BINFORD, L. F., and ADLER, P. A semiautomated microcalorimetric method of antibiotic sensitivity testing. *Am. J. Clin. Pathol.* 59: 86-94, 1973.
32. HEINZE, P., THRUPP, L., and ANSELMO, C. A rapid (4-6 hr) urine-culture system for direct identification and direct antimicrobial susceptibility testing. *Am. J. Clin. Pathol.* 71: 177-183, 1979.
33. NEUSSELL, H., and LINZENMEIER, G. A new semi-defined medium for antibiotic-sensitivity testing. Communication. All. 8th Congress of Antibiot. and Chemotherp. Athens, 1973.

