

Validez de dos métodos de cultivo y recuento bacteriano empleados en el diagnóstico de infecciones urinarias

**Andrey Payán, M.Sc.¹, Claudia Patricia Valencia, M.Sc.²,
María Victoria Amaya, Bact.³, Jaisury Arango, Bact.³,
Mildrey Mosquera, Bact.³, Carolina Quiroz, Bact.³**

1. Profesor Asociado, Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia. anpayan@telesat.com.co

2. Profesora Asociada, Escuela de Enfermería, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia

3. Estudiante de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

RESUMEN

El urocultivo es el procedimiento de laboratorio que se realiza con más frecuencia para el diagnóstico microbiológico de infección del tracto urinario; por esto es importante conocer la validez de los métodos de cultivo y recuento bacteriano que se utilizan en la actualidad en Cali. En este estudio se procesaron 144 muestras de orina que se remitieron a la Sección de Bacteriología del Laboratorio Clínico del Hospital Universitario del Valle (HUV), para ser sometidas a cultivo. Cada una de las muestras se cultivó por los métodos de siembra de Kass y tradicional de "cuatro estrías" evaluados en este estudio y por el método de dispersión con asa de vidrio, que se utilizó como método de referencia o estándar de oro. Se evaluaron estos dos métodos en particular, porque son los más utilizados en los laboratorios clínicos de rutina de Cali y se han adoptado empíricamente. Para el método de Kass se determinó una sensibilidad de 40%, una especificidad de 87%, un valor predictivo positivo de 73% y un valor predictivo negativo de 62%. En el método tradicional de cuatro estrías la sensibilidad fue de 48%, la especificidad de 84%, el valor predictivo positivo de 73% y el valor predictivo negativo de 65%. Por los resultados obtenidos, se demostró que las técnicas evaluadas no son recomendables para uso de rutina en el laboratorio clínico porque podría favorecer la no aplicación de un tratamiento oportuno a un paciente o producir un gasto innecesario de insumos y tiempo en el laboratorio.

Palabras claves: Urocultivo. Infección urinaria. Métodos de siembra.
Métodos de recuento. Evaluación de pruebas.

La infección del tracto urinario (ITU) se define como la entrada y multiplicación de microorganismos en uretra, vejiga, ureteres o riñones. Los microorganismos causales pueden ser bacterias, virus, hongos o parásitos, pero son las bacterias las que con mayor frecuencia se encuentran como agentes etiológicos de las infecciones en este sitio, probablemente porque ellas hacen parte de la flora normal de las mucosas que rodean la uretra¹. Las ITU están contempladas dentro de las entidades más frecuentes en la práctica clínica diaria, son capaces de inducir daño renal que puede llevar a la pérdida funcional del órgano y usualmente son el punto de partida de bacteriemias y/o sepsis².

El cultivo de orina es uno de los métodos más empleados como apoyo para el diagnóstico de ITU, pues permite la identificación del número y los tipos de bacterias presentes en la orina². Por las características inherentes a los métodos de siembra que se emplean para depositar las muestras en los agares de aislamiento primario, se obtienen colonias de crecimiento bacteriano que se distribuyen de formas diferentes. Esta distribución es aleatoria y depende de la técnica utilizada. Sin embargo, en algunas ocasiones las colonias bacterianas quedan tan cerca unas de otras que se dificulta su diferenciación, enmascarándose las diferentes morfología o impidiendo realizar un recuento preciso. Así, la técnica utilizada podría influir en la interpretación del microbiólogo que lee el cultivo y toma una decisión de proseguir o no con análisis microbiológicos adicionales con base en este primer aislamiento bacteriano.

A pesar de que las normas internacionales recomiendan la técnica de dispersión con asa de vidrio para la siembra de muestras de orina^{3,4} con frecuencia se utilizan metodologías diferentes, como las que se evalúan en este artículo, porque tienen un procedimiento técnico más sencillo y son más «fáciles» de interpretar.

En los laboratorios clínicos de la ciudad de Cali y de otras ciudades no existe uniformidad en la aplicación de las técnicas relacionadas con los métodos de siembra y recuento bacteriano empleados en el diagnóstico bacteriológico de ITU (comunicaciones personales del Colegio de Bacteriólogos del Valle). Esto trae como consecuencia una gran variación en los informes y a menudo, resultados contradictorios entre los diferentes laboratorios clínicos que disminuyen la utilidad diagnóstica. Hasta el momento no se conocen estudios que permitan establecer la validez de estos métodos alternativos, que se utilizan de rutina en los laboratorios de la ciudad.

Las medidas de predicción tienen importancia en la salud pública porque indican la capacidad de una prueba para predecir, como su nombre lo indica, el porcentaje de la población que realmente tiene la enfermedad en el momento de su aplicación. En este caso, son útiles porque permiten determinar dentro de un laboratorio, el porcentaje de muestras que realmente cumplen con los criterios para ser procesadas. Esto es particularmente importante pues redundante en diagnósticos acertados, mejora la calidad en términos de certeza, disminuye costos y favorece el manejo adecuado y oportuno de los pacientes.

En este estudio se calculó la validez del método de siembra de Kass³ y de un método tradicional al que denominamos de "cuatro estrías" (CE), empleados en el diagnóstico de ITU, tomando como prueba de referencia el método de dispersión con asa de vidrio³, que es el método recomendado para laboratorios de rutina por la Asociación Americana de Microbiología (ASM)⁴.

MATERIALES Y METODOS

Especímenes clínicos. Entre octubre y diciembre de 1997 se estudiaron 144 muestras de orina de pacientes hospitalizados y ambulatorios. Estos especímenes se remitieron a la Sección de Bacteriología del Laboratorio Clínico del Hospital Universitario del Valle (HUV) para que se les realizara cultivo bacteriano. Como la gran mayoría de muestras que se envían de rutina para urocultivo son negativas, en el presente estudio se incluyeron aquellas muestras que previamente hubiesen tenido un recuento ³ 1,000 unidades formadoras de colonias por mililitro de orina (UFC/ml). Se empleó la técnica de dispersión con asa de vidrio para hacer esta selección. Los especímenes clínicos se almacenaron a 4° C por 24 horas hasta que se procesaron siguiendo las recomendaciones para el manejo de este tipo de muestras⁵. Se emplearon controles de crecimiento negativos y positivos durante todo el estudio.

Procedimiento. Empleando un asa de alambre calibrada de 0.001 ml se sembraron las muestras de orina sin centrifugar por cada una de las tres técnicas que serán descritas más adelante. El medio de cultivo utilizado fue agar con cisteína y lactosa deficiente en electrólitos (CLED) (OXOID®, Maryland, USA).

Para disminuir la probabilidad de sesgos en manipulación e interpretación del recuento, en cada sesión de trabajo se asignó un método diferente a las personas que realizaron las técnicas de siembra a partir de alícuotas provenientes de un mismo espécimen clínico. Los cultivos se incubaron a 35° C por 18-24 horas en aerobiosis para su posterior recuento y diferenciación de colonias. De acuerdo con los resultados obtenidos se determinó si las muestras eran aptas para proseguir con el estudio microbiológico o no.

Técnicas de cultivo y recuento

¥ Técnica de cultivo y recuento por el método de dispersión con varilla de vidrio (método de referencia o estándar de oro). Para el desarrollo de esta técnica se siguió el procedimiento descrito por Gómez⁵ y Collin³. La muestra tomada con el asa calibrada se depositó en el centro de la superficie del medio de cultivo, luego con una varilla de vidrio en forma de "L" se dispersó la muestra sobre toda la superficie del agar rotando la caja de Petri por lo menos dos veces para asegurar una distribución uniforme (Figura 1). Después del período de incubación se contaron una a una las colonias aisladas sobre el medio y el número total se multiplicó por 10³ para calcular el número de UFC/ml.



Figura 1. Métodos de dispersión con varilla de vidrio

¥ Técnica de cultivo y recuento por el método de Kass. Para el desarrollo de esta técnica se siguió el procedimiento descrito por Gómez⁵; se inoculó el medio depositando la cantidad de muestra tomada con el asa calibrada en el centro del agar y a partir de ahí se trazó una línea recta de extremo a extremo de la caja. Con la misma asa, y sin tomar más muestra ni esterilizarla, se realizó una estriación en zigzag de manera que interceptara la línea central de lado a lado (Figura 2). Los parámetros utilizados para obtener el recuento de UFC después del período fueron los

siguientes: si existía crecimiento en todas las líneas de siembra, se consideraba un recuento ³ 100,000 UFC/ml. Si crecía en la línea central y hasta la mitad de las líneas que interceptan a ésta, el recuento era de 75,000 UFC/ml. Si crecía sólo en la línea central era compatible con un recuento de 50,000 UFC/ml. Cuando se obtenía crecimiento de sólo la mitad de la línea central de siembra, se consideraba que correspondía a un recuento de 25,000 UFC/ml. Cuando no se presentaba crecimiento completo en una línea, se hacía una aproximación al parámetro que el lector consideraba más apropiado.

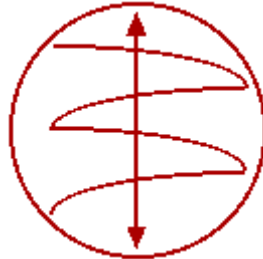


Figura 2. Método de Kass

¥ Técnica de cultivo y recuento por el método tradicional de "cuatro estrías". Se inoculó la superficie del medio realizando cuatro estrías separadas que van de extremo a extremo de la caja. Se realizó con el asa calibrada, sin tomar más muestra cada vez y sin esterilizarla entre una y otra línea (Figura 3). El crecimiento completo de colonias en cada línea representaba 25,000 UFC/ml. De igual manera cuando no se presentaba crecimiento completo en una línea, se hacía una aproximación al parámetro que el lector consideraba más apropiado.



Figura 3. Método tradicional de "cuatro estrías"

Diferenciación de colonias. De acuerdo con la apariencia de cada colonia se determinó el número de tipos de colonias presentes en el cultivo. Para esto se tuvo en cuenta características tales como tamaño, elevación, consistencia y brillo, entre otras.

Parámetros de interpretación. Existen diferentes normas de interpretación de cultivos de muestras de orina que difieren de una fuente bibliográfica a otra⁶. El Cuadro 1 muestra los parámetros establecidos en este estudio para determinar si se debía seguir o no el proceso de identificación bacteriana del espécimen sembrado en el agar por cualquiera de los tres métodos (muestra apta o no apta, respectivamente). Estos se elaboraron con base en las pautas más aceptadas en publicaciones internacionales^{4,7} y en las que con frecuencia son empleadas para este tipo de muestras en Colombia.

Cuadro 1
Parámetros empleados para determinar si se continúa con el estudio microbiológico de la muestra sembrada en el agar por cualquiera de los tres métodos

Recuento	Nº de tipos de colonia	Muestra apta	
		+a	-b
< 10 ⁴ UFC/ml	Uno	X	
< 10 ⁴ UFC/ml	Más de uno		X
Entre 10 ⁴ -10 ⁵ UFC/ml	Uno	X	
Entre 10 ⁴ -10 ⁵ UFC/ml	Más de uno		X
≥ 10 ⁵ UFC/ml	Uno o dos	X	
≥ 10 ⁵ UFC/ml	Más de dos		X

a. Se continúa el proceso de identificación y se realizan pruebas de susceptibilidad
b. No se continúa el proceso y se pide una nueva muestra o se descarta

Análisis estadístico. La validez de los métodos a evaluar se midió con base en la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN). Para el caso concreto de este estudio, la sensibilidad indica la proporción de las muestras aptas para continuar con el proceso microbiológico, encontradas por el método a evaluar del total de las muestras aptas identificadas por el método de referencia («verdaderas aptas»). La especificidad expresa la proporción de las muestras no aptas para continuar con el proceso microbiológico, encontradas por el método a evaluar del total de las muestras no aptas identificadas por el método de referencia⁸ (verdaderas no aptas). En otras palabras, estas medidas indican la capacidad de la prueba para saber cuál muestra es adecuada o no para un proceso microbiológico subsecuente. Los valores predictivos de estas pruebas determinan la probabilidad de que una muestra sea verdaderamente apta o no pues la misma hubiera resultado positiva o negativa por el método a evaluar.

Para fines de análisis estadísticos y de notación, las muestras que fueron aptas se describen como positivas y las no aptas como «negativas». La información fue consignada en tablas de cuatro casillas (Cuadros 2 y 3).

Cuadro 2
Método estándar vs. el método de Kass

		Estándar		Total
		+	-	
Kass	+	27	10	37
	-	41	66	107
Total		68	76	144

Cuadro 3
Método estándar vs. el método de "cuatro estrías"

		Estándar		Total
		+	-	
Cuatro estrías	+	32	12	44
	-	34	64	98
Total		66	76	142

RESULTADOS

En los Cuadros 1 y 2 se resumen los resultados obtenidos en los cultivos de las muestras sembradas por las tres técnicas. Se observa una diferencia en el número total de muestras procesadas por los dos métodos evaluados, porque por razones técnicas, se descartaron dos de los especímenes sembrados aplicando el método de "cuatro estrías".

De las 144 muestras procesadas por el método de Kass, 37 fueron positivas y 107 negativas frente a 68 aptas y 76 no aptas de acuerdo con el método de referencia.

Por el método tradicional de cuatro estrías se procesaron un total de 142 muestras de las cuales 44 fueron positivas y 98 negativas frente a 66 aptas y 76 no aptas de acuerdo con el método de referencia.

La sensibilidad y la especificidad del método de Kass fueron de 40% y 87% en tanto para el método tradicional de CE se estimaron en 48% y 84% respectivamente. Los valores predictivos positivo y negativo para el primer método fueron de 73% y 62% y para el segundo, 73% y 65%, correspondientemente (Cuadro 4, Figura 4).

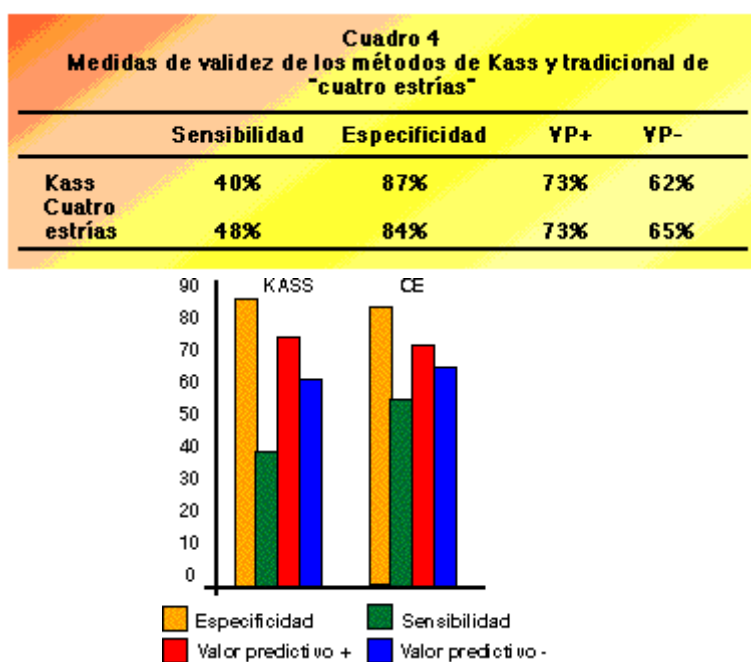


Figura 4. Especificidad, sensibilidad y valor predictivo de las pruebas en estudio comparadas con el método de referencia para la detección de muestra aptas

DISCUSION

En estudios anteriores se ha demostrado que el método de mayor ayuda diagnóstica en las ITU es el recuento de colonias en el cultivo de la orina recién emitida^{4,9-12}, que permite identificar el número y los tipos de bacterias que pueden estar presentes en la muestra.

Una ventaja que brinda el cultivo sobre otros métodos de recuento bacteriano, es que en el aislamiento bacteriano primario se puede determinar si se amerita hacer pruebas de identificación y susceptibilidad a las bacterias cultivadas, o si por el contrario el espécimen corresponde a muestras no aptas como las indebidamente almacenadas y

recolectadas o contaminadas con microorganismos de la flora normal del individuo. Por tanto, es importante que los cultivos sean bien interpretados y se eviten acomodaciones subjetivas en la lectura.

Las variaciones que se producen en la interpretación de los cultivos sembrados por las diferentes técnicas son inducidas por el hecho de que las colonias bacterianas no crecen de manera continua sobre las líneas de siembra, dificultando la aplicación de los parámetros de recuento, particularmente en los métodos que se validaron en este trabajo. Otro factor que interfiere en la interpretación de los cultivos y que se evidenció en los resultados del presente estudio, fue el hecho de que las colonias no siempre crecieron suficientemente aisladas unas de otras impidiendo distinguir con claridad su morfología. De este modo se introdujo otro factor que dificultó la estimación del número de UFC/ml y el establecimiento de la existencia de tipos de colonias diferentes.

Así pues, la técnica de siembra empleada en el cultivo determina la dispersión y distribución de las colonias de las bacterias sobre el agar, lo que facilita o dificulta la interpretación inicial. Este factor se refleja en la baja sensibilidad, especificidad, VPP y VPN obtenidos en el presente estudio en las técnicas evaluadas de la siembra.

La sensibilidad de 40% del método de Kass, indica que de 100 muestras verdaderamente aptas para ser procesadas, este método sólo capta 40, dejando el resto sin una correcta evaluación. La proporción de falsos negativos (FN), entonces, es muy alta, lo cual tiene serias implicaciones clínicas y económicas, porque el método de Kass deja 60 de 100 muestras aptas para procesar sin un resultado acertado, y finalmente se descartan como negativas o contaminadas. El VPP de este método (73%), señala que de 100 muestras aptas, sólo 73 cumplirán con los requerimientos necesarios para ser procesadas (número total y tipos de gérmenes determinados).

El método tradicional de CE presenta un comportamiento similar, y en promedio de 100 especímenes verdaderamente aptos para procesar, sólo capta la mitad. En cambio en términos de especificidad el método mejora, porque de 100 muestras que no reúnen los criterios para continuar con el proceso microbiológico (verdaderamente no aptas), el método de CE capta correctamente casi 85 de ellas, dejando el resto como falsos positivos (FP).

Se observó entonces, que las dos técnicas evaluadas tienen una mayor aplicabilidad en la determinación de las muestras que no deben ser procesadas (VPP 73% y 80%). Por el contrario, se estableció que tienen poca utilidad en la determinación de las muestras aptas para ser procesadas, siendo el método de Kass el menos recomendado (VPN 40% y 48%).

Los resultados de este estudio están a favor de que las técnicas evaluadas no son apropiadas para su utilización en un laboratorio clínico porque se podría descartar un número apreciable de muestras que son realmente positivas (FN: 50%-60%), lo cual se traduciría en serias complicaciones que pueden incluso comprometer la vida del paciente por la falta de un tratamiento adecuado y oportuno. Además, el hecho de determinar como positivas algunas muestras que no lo son (FP: 27% y 20%), significaría un desperdicio de insumos y tiempo, aumentando los costos por muestra y podría llevar a la administración de un tratamiento innecesario que incrementan las probabilidades de inducir resistencia de los microorganismos a los antibióticos y los costos a los pacientes y a los servicios de salud.

Aún más, si se aplican las mismas técnicas de siembra estudiadas aquí en localidades en donde el número de muestras verdaderamente aptas sea menor a la del presente estudio (prevalencia: 45%) se puede esperar que el VPN aumente y el VPP disminuya agravando las consecuencias al dejar pacientes sin diagnóstico y tratamiento oportunos.

CONCLUSION

Las técnicas de siembra de Kass y el método tradicional de CE no son válidas para la siembra de muestras de orina y se recomienda que se adopte el método de dispersión con asa de vidrio³ sugerido por la Asociación Americana de Microbiología⁴ para la siembra de este tipo de especímenes clínicos, y de este modo asegurar la uniformidad y calidad de los análisis realizados.

SUMMARY

The uroculture is the laboratory procedure that is more frequently carried out for the microbiologic diagnosis of urinary tract infections. Therefore, it is important to estimate the validity of bacterial count culture methods currently used. In this study, we processed 144 urine samples submitted for culture at the clinical laboratory of the Hospital Universitario del Valle in the city of Cali. All of the samples were cultured by the Kass methodology and "four strias" traditional method. Additionally, the samples were cultured employing the dispersion method with glass handle which was used as gold standard. For the Kass technique the sensibility was 40%, specificity was 87%, and positive and negative predictive values were 73% and 62%. In the four strias traditional methodology the sensibility was 48%, specificity was 84%, the positive predictive value was 73% and the negative predictive value was 65%. From the obtained results it was demonstrated that the evaluated techniques are not recommended for use in the clinical laboratory.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al doctor Fabián Méndez, epidemiólogo de la Secretaría de Salud Departamental del Valle del Cauca, por la revisión de los análisis estadísticos y a las bacteriólogas, auxiliares de laboratorio y demás personal que trabaja en la Sección de Bacteriología del Laboratorio Clínico del Hospital Universitario del Valle, sin cuya colaboración no hubiese podido realizarse este estudio.

REFERENCIAS

1. Jiménez JF, Vera CD. Infección urinaria. Terminología y etiopatología. En Infección urinaria. Jiménez JF (ed.). Monografías clínicas en enfermedades infecciosas. Barcelona; Ediciones Doyma, 1991.
2. Sobel JD, Kaye D. Infecciones del tracto urinario. En Principios prácticos de enfermedades infecciosas. Mandell G, Douglas RG, Bennet JE (eds.). 3ª ed. Vol 1. Buenos Aires; Editorial Médica Panamericana, 1990.
3. Collins CH, Lyne P. Microbiological methods. 6th ed. Londres; Butterworth, 1989.
4. Forbes BA, Granato PA. Processing specimens for bacteria. En Manual of clinical microbiology. Murray PR, Baron EJ, Pfaller M, Tenover FC, Tenover FC (eds.). Washington; ASM Press, 1995.

5. Gómez GE. Infección de las vías urinarias III. Lab Med 1996; 4: 11-21.
6. Leñanos-Miranda A, Contreras I, Camacho R, Villagómez E, Cervantes I. Rendimiento diagnóstico de algunas pruebas en orina en las infecciones de vías urinarias. Rev Invest Clin 1996; 48: 117-23.
7. Sodeman MT. A practical strategy for diagnosis of urinary tract infections. Clin Lab Med 1995; 15: 235-50.
8. Riegelman RK, Hirsch RP. Cómo estudiar un estudio y probar una prueba: lectura crítica de la literatura médica. Organización Panamericana de la Salud. Publicación Científica N° 531, Washington; Little Brown & Co, 1992. Pp. 112-24.
9. Kunin C. Infecciones urinarias, diagnóstico, profilaxis y tratamiento. 2ª ed. Barcelona; Ediciones Toray, 1973.
10. Navarro F, Fuentes I, Izquierdo C, Sánchez F, Prats G. Evaluación del medio cromogénico CPS ID2 (Bio Merieux) en urocultivos. Enfermedades infecciosas. Microbiol Clin 1996; 14: 215-19.
11. Santos MA, Cruz O, Mos E, Schmidt BJ. Procedimiento rápido para la realización de urocultivo cuantitativo en 24 horas. Bol Med Hosp Infant Mex 1983; 40: 296-98.
12. Vickers P, Ahmad T, Coulthard MG. Diagnosis at urinary tract infections in children: fresh urine microscopy or culture. Lancet 1991; 388: 767-70.