



ISSN 1988-6047 DEP. LEGAL: GR 2922/2007 Nº 14 – ENERO DE 2009

ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LA ORINA: UROCULTIVO

AUTORIA ROSARIO ALORS CORREDERAS
TEMÁTICA MICROBIOLOGÍA
ETAPA FORMACIÓN PROFESIONAL

Resumen

Esta práctica que está encuadrada dentro del ciclo formativo de grado superior: Laboratorio de Diagnóstico Clínico, se hace necesaria para que el alumno alcance las capacidades terminales de dicho ciclo y en definitiva obtenga el título.

Palabras clave

Urocultivo, sedimento, sobrenadante, tinción.

UROCULTIVO:

Este tipo de análisis se hace cuando se sospecha una infección de cualquier parte del sistema urinario. La flora o microbiota normal o residente se encuentra en la parte baja de la uretra; en cualquier otra parte, sería una infección. El urocultivo comprende varias etapas:

Sedimento urinario: centrifugamos la muestra de orina. Trabajaremos con 2 muestras, de las cuales una es una muestra original y la otra es una muestra que hemos contaminado.

a) De la orina original tomamos 5ml y lo ponemos en un tubo de fondo cónico. Centrifugamos 5 minutos a 1500rpm.

b) En el caso de la orina contaminada, ponemos 1,5ml en un tubo eppendorf y centrifugamos en la microcentrifuga algo menos de 5 minutos.

Una vez sedimentado, quitamos el sobrenadante, dejando un poco para poder resuspender el sedimento. Y ya tenemos la muestra para trabajar con ella y observar al microscopio en fresco o con tinción de Gram.

+Preparación en fresco: con la pipeta de 100 µl. Pipeteamos y ponemos una gota en la superficie de un porta y cubrimos con un cubre. Esto se puede observar al microscopio con objetivo de 40x y con poca luz.

En este tipo de preparación podemos ver:

*Tipos de cristales en diferentes campos. Si aparecen con relativa frecuencia, podría ser indicativo de cálculos renales o afecciones de la parte superior del sistema excretor.

Cristales de urea: tienen morfología cuadrada.

Cristales de oxalato: morfología en sobre.

Cristales de fosfato: morfología en ataúd.



ISSN 1988-6047 DEP. LEGAL: GR 2922/2007 Nº 14 – ENERO DE 2009

*Restos de epitelio en forma de masas irregulares o células en descamación del epitelio excretor. Estas células tienen la morfología de un “huevo frito”, desgarradas e irregulares. Cuando se presentan en gran cantidad, puede ser indicativo de infección.

*Detección de bacteriuria en el sedimento: presencia de bacterias en la orina.

*Piuria: presencia de leucocitos: Hay que tener en cuenta el número de polimorfonucleares (PMN) y, dentro de éstos, los neutrófilos por campo de visión. Desde que sean 10-12, ya hay piuria manifiesta.

*Hematuria: medimos la presencia de glóbulos rojos en la orina.

*En este examen también podemos medir el pH, ver el aspecto de la orina.

+Tinción de Gram:

- **Fundamento:** divide a los microorganismos en Gram positivas y Gram negativas. Las Gram positivas son aquellas que resisten la acción de colorante del disolvente alcohol-acetona, tras el tratamiento con un colorante básico y lugol, mientras que las Gram negativas son decoloradas siendo posteriormente teñidas con un colorante de contraste como puede ser la *fucsina* diluida o *safranina*, este hecho se debe a la diferente composición de la pared celular. Es conveniente realizar la tinción de gram sobre células de cultivos jóvenes ya que algunos microorganismos son gram positivos solo en la fase de crecimiento.
- **Material:** portaobjetos, mechero, asa de platino, pipeta, pinzas de madera, microscopio óptico y equipos de tinción (cristalizador, barras paralelas y frascos lavaderos).
- **Reactivos:** lugol, cristal violeta, fucsina diluida o safranina, alcohol 96°, aceite de inmersión.
- **Técnica:**
 - 1º. Realizar la preparación con la correspondiente fijación.
 - 2º. Aplicar sobre el porta el primer colorante: cristal violeta durante 1 minuto.
 - 3º. Lavar con agua.
 - 4º. Añadir la sustancia mordiente, que en este caso es el lugol, y dejar 1 minuto.
 - 5º. Lavar con agua.
 - 6º. Decolorar con alcohol 96° unos 20 segundos.
 - 7º. Lavar con agua.
 - 8º. Cubrir el porta con el segundo colorante o de contraste, que es la safranina, 1 minuto.
 - 9º. Lavar con agua y dejar secar. Observar con objetivo de inmersión.
- **Resultado:**

Muestra original: en la preparación en fresco hemos observado las células “huevo frito”, es decir, existe descamación del epitelio excretor; glóbulos rojos en poca cantidad (3-4 por campo), existe hematuria pues; glóbulos blancos (3-4 por campo) pero que no es significativa; bacterias de fondo con movimiento browniano, es decir, móviles, pero no desplazantes.

En la prueba gram, obtenemos que las bacterias presentes en la orina son coco-bacilos gram- y tienen disposición a formar parejas.

Muestra contaminada: en la preparación en fresco, observamos una cantidad enorme de glóbulos rojos, que nos hace pensar que existe hematuria significativa. Así mismo, podemos ver también la existencia de bacterias móviles parecidas a la muestra anterior.

En la tinción de gram no hemos observado ningún tipo de bacteria. Pero sí algún que otro glóbulo rojo. En este caso, no podemos asegurar el tipo de bacteria, o si existe una infección bacteriana.



ISSN 1988-6047 DEP. LEGAL: GR 2922/2007 N° 14 – ENERO DE 2009

En el caso de que existan bacterias, se procede al siguiente experimento:

Determinación e Identificación del agente infeccioso

- **Determinación cuantitativa:**

Tomamos 5ml de la muestra contaminada homogeneizada, porque se va sedimentando con el tiempo. De aquí, cogemos un 1ml y hacemos diluciones seriadas desde hasta $1/10000000$ (10^{-7}) en tubos con 9ml de suero fisiológico.

Luego, tomamos 0,1ml de las diluciones 10^{-5} y 10^{-7} y sembramos 3 placas para proceder al urocultivo y averiguar la cantidad de UFC/ml que existe en la orina. Esto es un procedimiento cuantitativo.

Si no tenemos idea de la cantidad de microorganismos que pueden haber por ml, tenemos que hacer diluciones hasta 10^{-10} . Vamos a utilizar el medio de cultivo CLED (diaminoácido cisteína, lactosa y deficiente en electrolitos) que se utiliza para aislar patógenos urinarios. Lleva indicador de pH azul de bromotimol, que varía de amarillo a azul. Este medio es diferencial porque lleva lactosa, de manera que podemos diferenciar entre fermentadores de lactosa y los que no por medio del indicador de pH. Si las colonias no son fermentadoras, crecen, pero el medio permanece verde o azul.

Este medio está preparado para aislar *Proteus* sp, que es un patógeno urinario. Por lo que es selectivo, debido a lo siguiente: *Proteus* sp es una bacteria invasiva en los cultivos de medios sólidos. Pero si hacemos deficiente de electrolitos el medio, se inhibe el crecimiento de la mayoría de las bacterias, pero *Proteus* crece de manera normal, no invasiva.

Nota: las placas de Petri tienen 90cm de diámetro.

Sembramos pues las 3 placas por extensión o superficie con el asa de siembra.

*De la muestra original, que en un principio sabemos que tiene piuria y bacteriuria, tomamos del bote donde se encuentra la muestra y hacemos diluciones seriadas hasta 10^{-4} y hacemos siembra de las 3 últimas diluciones también en medio CLED.

- **Determinación cualitativa:**

Tenemos 3 medios de cultivo sólidos diferentes para determinar diferentes cualidades del microorganismo patógeno:

-MSA (Agar Salado Manitol). Es un medio selectivo y diferencial. Es selectivo para *Staphylococcus*, debido a que tenemos un 7,5% de NaCl y S. Es halotolerante, de manera que se inhibe el crecimiento de la mayoría de las bacterias.

El medio es diferencial al presentarse manitol y rojo de fenol como indicador de pH (amarillo para ácidos y rojo para básicos). Esto es para ver si existe fermentación del manitol. Si en el medio hay crecimiento y el medio permanece de color rojo, podemos decir que el microorganismo es *Staphylococcus* No patógeno. Pero si existe viraje del indicador de pH a amarillo, es que el microorganismo es manitol+ y podemos asegurar que es *Staphylococcus aureus*, que es el único que fermenta el manitol en medios MSA.

-EMB: es un medio selectivo y diferencial. Se intenta buscar enterobacterias, que es típico en los análisis de orina. Es selectivo porque lleva eosina y azul de metileno (2 colorantes). Como las bacterias Gram+ son muy sensibles a los colorantes, inhibimos su crecimiento y favorecemos el de Gram-.

Además, es diferencial porque lleva lactosa. La no fermentación de la lactosa dará colonias incoloras. Las colonias fermentadoras darán colonias coloreadas oscuras. Es típico que crezca *E. coli*, que crece muy bien en medio EMB y da unas colonias características, negras con intenso brillo metálico verde iridiscente.



ISSN 1988-6047 DEP. LEGAL: GR 2922/2007 Nº 14 – ENERO DE 2009

-Sabouraud-Cloranfenicol: presenta un pH 4,5-5 y cloranfenicol. Es sólo selectivo, para averiguar la presencia de hongos microscópicos como las levaduras. Las levaduras son ácidotolerantes, por lo que crecen a bajo pH, cosa que la mayoría de las bacterias no pueden hacer, porque se inhibe su crecimiento. También lleva cloranfenicol, que es un efectivo antibiótico para las células procariontas. Se utiliza sobre todo para candidas.

Tomamos muestra de la orina y nuestro objetivo es obtener colonias cada vez más aisladas. Para ello, sembramos por agotamiento, haciendo estrías en superficie con la técnica de los 4 cuadrantes. Tanto para la orina problema como para la orina original.

Resultados:

Cuando contamos las colonias y hacemos cálculo de UFC/ml, podemos obtener un dato que se corresponde dentro de uno de los 3 posibles rangos:

- $<10^4$ UFC/ml significa que pudo haber sido una contaminación del medio de cultivo.
- $10^4 - 10^5$ podemos ponerlo como caso dudoso.
- $>10^5$ ya es una infección urinaria. Normalmente suele estar causada por un único tipo de microorganismo.

Ejemplo: en la placa 10^{-2} hemos hecho un recuento de 80 colonias. Entonces, en 1ml habrán $80 \times 10^2 \times 10$ (porque pusimos 0,1ml en la placa al sembrar).

Nos fijamos además si existe más de un tipo de colonia y la morfología que presentan. El resultado obtenido es que en el medio CLED de orina original diluida a 10^{-2} no hemos obtenido ni una colonia. Con esto podemos decir que hay <1000 UFC/ml. En el medio CLED sembrado con la orina contaminada diluida 10^{-6} tampoco hay colonias, por lo que afirmamos que hay <10000000 UFC/ml. Podemos también concluir que nos hemos pasado con las diluciones, por lo que pudimos haber enmascarado una infección.

NOTA: presuntamente nos tenían que haber crecido en las placas sembradas con orina contaminada. Pero como no fue así, nos darán una bacteria hipotética para poder seguir con el urocultivo.

La orina, cuando se encuentra en la vejiga, es estéril, por tanto, cuando se toma una muestra como la PUNCIÓN SUPRAPÚBICA, directamente en la vejiga, debe estar libre de gérmenes. Pero en la uretra hay flora microbiana, que se arrastra con la orina, por lo que $<10^4$ UFC/ml es normal encontrar.

Debemos distinguir si la infección es nosocomial o de ambulatorio (fuera de hospital). La infección nosocomial puede estar causada por dos tipos de microorganismos, en que pueden participar los dos a la vez. En pacientes de ambulatorio, la infección es siempre monobacteriana.

El grupo más implicado en ambas infecciones son las enterobacterias y la bacteria más representativa es E. Coli, que es la que causa hasta 80% de las infecciones extrahospitalarias y 40% en hospitales.

Klebsiella pneumoniae también está relacionada con las infecciones urinarias. *Proteus* sp. está implicada en infecciones sobre todo en embarazadas. Las pseudomonas son un problemas porque son difíciles de tratar, puesto que son muy resistentes. Los enterococos, por su proximidad al tracto urinario, puede producir infección.

Mycobacterium tuberculosis no es muy frecuente que se deje revelar en las tinciones y afecta generalmente al riñón, produciendo tuberculosis renal. Y se puede revelar su presencia en la orina, pero es muy difícil, hay que revelar con ácido alcohol resistente, que es la técnica de Ziehl-Neelsen.

Los virus también pueden producir infección y se le conoce como viuria, y para revelarlos, hay que cultivarlos sobre células. La viuria suele ir acompañada de piuria y, algunas veces, hematuria. En



ISSN 1988-6047 DEP. LEGAL: GR 2922/2007 N° 14 – ENERO DE 2009

muchas ocasiones, curan espontáneamente, son infecciones autolimitadas, aunque no en individuos inmunodeprimidos o no inmunocompetentes.

Los especímenes, para el estudio, deben ser de buena calidad y representativo, en que la flora debe ser mantenida como tal hasta su análisis. La muestra debe recogerse de la siguiente manera (primera orina de la mañana):

*Mujeres:

- Se apartan los labios uretrales.
- Lavar vulva en solución jabonosa neutra no bactericida 3 veces seguidas.
- Secarse con gasa estéril.
- Se debe recoger el 2º volumen de la micción.

*Hombres:

- Se retira el prepucio.
- Lavar el glande 3 veces con solución jabonosa.
- Secar con gasa estéril.
- Se recoge el 2º volumen de la micción.

Inmediatamente debe producirse el cultivo. NO se debe incubar a 4°C porque se puede matar al 10% de la población bacteriana por choque térmico.

Tomamos una colonia de la orina contaminada (que supuestamente creció) y hacemos una tinción Gram para confirmar. La observación al microscopio nos revela que tenemos cocobacilos Gram-. Pero según el tipo de Gram que salga, habrá que hacer una serie de pruebas para identificar al microorganismo:

Gram-

- **TSI (Triple Sugar Iron):** lleva 3 azúcares: glucosa 0,1%, sacarosa y lactosa 1%; y también lleva hierro. Lleva un indicador de pH rojo fenol (amarillo-naranja-rojo), tampón neutro y peptona (hidrolizado de proteínas). Nos va a dar varios datos interesantes:
 - El medio es un tubo inclinado con una zona aeróbica y otra anaerobia. Se inocula por picadura con la aguja de siembra y luego hacemos zigzag en la superficie del medio, por lo que hacemos dos lecturas:
 - ⚙ Fermentación sólo de glucosa: en la zona anaerobia se producen ácidos por la fermentación de la glucosa y, una vez se acaba ésta, se echa mano de las peptonas, que su utilización da productos básicos y amoníaco, con lo que en la zona de picadura nos podemos encontrar 2 colores: rojo y amarillo. En la zona aerobia, se respira la glucosa, dando ácido pirúvico, pero que este luego tiende a dar compuestos neutros. Cuando se agota la glucosa, se utiliza la peptona. Por lo que predomina un ambiente básico, con lo que la zona superior del medio será de color rojo.
 - ⚙ Fermentación de glucosa, sacarosa y/o lactosa: siempre hay azúcares disponibles, con lo que nunca se recurre a la peptona. De manera que siempre se producen ácidos y el medio de cultivo siempre estaría de color amarillo.

Resultado: lactosa+



ISSN 1988-6047 DEP. LEGAL: GR 2922/2007 N° 14 – ENERO DE 2009

• **Producción de gas:** se puede ver en el tubo. La producción de gas se debe a la presencia de la enzima FORMICO HIDROGENOLIASA. Las bacterias con esta enzima transforman el ácido fórmico en CO₂ y H₂. Si no se tiene la enzima, no se produce gas. Esto se observa en la zona anaerobia o en el fondo del tubo.

Resultado: gas+

• **Producción de SH₂:** hay enterobacterias capaces de reducir el tiosulfato a sulfhídrico y otras no. Esto tiene carácter taxonómico. El medio lleva tiosulfato (sal de azufre). La detección de la transformación la detectamos con sal de hierro, que se combina con el sulfuro de hierro y produce precipitado negro, que se puede observar sobre todo en la zona anaerobia, cosa que puede enmascarar al color amarillo de la fermentación.

Resultado: SH₂ -

• **Caldo urea:** es un medio líquido con rojo de fenol y tampón neutro, lleva glucosa y urea. Si la bacteria tiene la ureasa y desdobla la urea en CO₂ y NH₃, sube el pH.

Resultado: urea-

• **Caldo de lisina:** tiene color violeta intenso (indicador de pH púrpura de bromocresol) y lleva lisina. Si la bacteria tiene la enzima lisina descarboxilasa, la bacteria primero utiliza la glucosa del medio y el pH baja, pero si además tiene la enzima, es capaz de formar diamina, que alcaliniza el medio, volviéndose violeta, como al principio, indicando que la prueba es positiva.

Resultado: LDC+

• **Prueba oxidasa:** es una tirita blanca con reactivo para la enzima oxidasa en un extremo. Tomamos una colonia de un medio sólido y la frotamos en la tirita. Si se reduce el reactivo, que es tetrametilparafenilen diamina, entonces el espécimen es oxidasa+, dando un color azul oscuro.

Resultado: negativo.

• **Manitol-movilidad:** es un tubo con medio sólido en el que vamos a sembrar por picadura. Nos permite ver si se produce gas con la fermentación. Lleva rojo fenol. Si el medio se vuelve amarillo, es que la bacteria es manitol+. Además, también podemos observar la movilidad si existe turbidez en el medio.

Resultado: manitol+ y movilidad+

• **Caldo indol:** es un caldo al que se le añade triptófano. Se revela con este caldo la producción de triptofanasa, que desdobla el triptófano en indol y alanina, produciéndose luego ácido pirúvico y amoniaco. A esta prueba, después de la incubación, hay que añadir un reactivo, que puede ser:

-Kovacs

-Ehrlich

-James

Utilizamos solo uno. Lleva un alcohol que forma una fase orgánica hidrófila. Si la bacteria es indol+, se forma un anillo coloreado.

Resultado: indol+

C/ Juan Ávila Segovia N° 3 Escalera 1 3° B Granada 18003 csifrevistad@gmail.com



ISSN 1988-6047 DEP. LEGAL: GR 2922/2007 Nº 14 – ENERO DE 2009

Con las pruebas bioquímicas realizadas y sus correspondientes resultados, podemos deducir que nuestra bacteria la hemos identificado como E. coli.

Gram+

- **Agar salado:** lleva un 7,5% (75gr/litro) de NaCl. Se inhibe el crecimiento de la mayoría de las bacterias, y lo que se intenta es poner de manifiesto a Staphilococcus, porque sí crecen, sobre todo S. aureus. Se siembra por agotamiento en estrías en placa de Petri.
- **Catalasa:** se toma una pequeña cantidad de colonia y se pone en un porta. Añadimos peróxido de hidrógeno al 30%. Si existe burbujeo, es que se está produciendo H_2O y O_2 , poniendo de manifiesto a la catalasa. Esto nunca lo debemos hacer con colonias que procedan de un medio Agar-sangre, por que siempre da positivo.
- **Prueba de la Desoxirribonucleasa:** se utiliza el Agar DNAasa. Sembramos con una estría única de aproximadamente 2 cm de longitud y se incuba a $37^{\circ}C$ durante 24 horas. Después de incubar añadimos, inundando la placa, HCl 0,1 N que reacciona con el DNA presente apareciendo una zona turbia. A los 5 minutos realizamos la lectura de los resultados:
 - Se considera prueba positiva si aparece una zona clara alrededor de la línea de siembra.
 - Se considera prueba negativa si aparece turbidez en toda la superficie del medio de cultivo.En ocasiones este medio lleva indicadores que nos indican si el microorganismo posee la DNAasa sin necesidad de añadir el HCl. Estos indicadores pueden ser:
 - Verde de Metilo: prueba positiva: halo claro / prueba negativa: verde intenso
 - Azul de Toluidina: prueba positiva: halo rosa / prueba negativa: halo azul
- **Coagulasa:** S. aureus es capaz de producir una proteína llamada Coagulasa que es capaz de aglutinar el plasma en presencia de un factor contenido en el suero. Este factor reacciona con la coagulasa, activa el fibrinógeno y produce un coágulo de fibrina. Esta coagulasa se puede encontrar de forma ligada o en forma libre. El estudio de esta actividad coagulasa se puede llevar a cabo en tubo o en portaobjetos:
En Portaobjetos:
 - Poner una gota estéril de agua destilada o solución salina fisiológica sobre el porta.
 - Emulsionar suavemente con una suspensión espesa de Staphylococcus o una colonia tomada con un asa.
 - Mezclar suavemente la suspensión de Staphylococcus con el plasma que podamos tomar con un asa.
 - Observar la inmediata formación de un precipitado macroscópico.En tubo:
 - Poner en un tubo estéril de hemólisis 0,5 mL de plasma de conejo y 0,5 mL de un cultivo en caldo o placa. En este último caso se tomará un número suficiente de colonias.



ISSN 1988-6047 DEP. LEGAL: GR 2922/2007 Nº 14 – ENERO DE 2009

- Incubar en un baño a 37°C durante 4 horas. Observar cada 30 min.

Las bacterias patógenas son coagulasa+. Si es así, al día siguiente estará coagulado el medio. Esta prueba es correlativa con la prueba DNAsa.

- **Actividad Fosfatasa:** Algunas especies de *S. aureus* y *S. epidermidis* producen la Fosfata Alcalina. Esta enzima actúa sobre el Difosfato de Fenolftaleína y los transforma en Fenolftaleína libre. Esta Fenolftaleína libre, al reaccionar con un álcali da lugar a un color rojo rosado brillante.

Reactivos:

- Sal Sódica Difosfato de Fenolftaleína al 0,5% en agua destilada. Debe estar esterilizado por filtro de membrana (0,22 μ m como diámetro del poro)

Medios:

- Caldo Nutritivo: 3 mL de caldo por tubo. Esterilizar y antes de enfriar añadir una gota de reactivo.
- Agar Nutritivo

Método utilizando el caldo nutritivo:

Se inocularán 2 tubos rotulados como A y B con un inóculo denso de un cultivo puro y reciente (18-24 horas).

Incubar a 35°C durante 6 horas. Transcurrido este tiempo añadir 1 gota de NaOH 10N al 40% al tubo A.

Si no hay viraje, lo desechamos y continuamos la incubación con el tubo B hasta 24 horas.

Método utilizando el agar nutritivo:

Esterilizamos el medio, lo dejamos enfriar y le añadimos 2 mL de fenolftaleína al 5% por cada 98 mL de medio. Lo mezclamos y plaqueamos.

Sembramos por estría con un inóculo poco denso, procedente de un cultivo puro y reciente e incubamos a 37°C durante 24 horas.

Para proceder con la lectura es necesario exponer las colonias al vapor de amoníaco. Esto se puede hacer de dos formas:

- Tras la incubación mantenemos las colonias sobre un frasco abierto
- Agregar 1 mL de amoníaco a la tapa de la placa de Petri donde hemos realizado la siembra e invertimos el cultivo sobre ella.

Se considerará resultado positivo si aparece un color rojo rosado brillante

Se considerará resultado negativo si no se observan cambios. Colonias claras o blancas.

BIBLIOGRAFÍA:

Gonzalez de Buitrago, J.M. (2004). *Técnicas y métodos de laboratorio clínico*. Madrid: Masson
Granados Perez, R. y Villaverde Peris, C. (2003). *Microbiología Tomo I*. Madrid: Paraninfo.
Rotger Anglada, R. (1997). *Microbiología sanitaria y clínica*. Madrid: Síntesis.

Rosario Alors Correderas
rosarioalors@gmail.com
