



Identificación de *Escherichia coli* y Coliformes en Sepsis Urinaria Infantil con la Utilización del Medio Cromogénico-Fluorogénico CROMOCEN CC

VIVIAN QUESADA MUÑOZ,¹ CLAUDIO RODRÍGUEZ MARTÍNEZ,^{1*} JORGE LUIS MUÑOZ,² TERESA INFANTE DILÚ,² ERNESTO HERNÁNDEZ ROBLEDO³ Y JULIÁN PÉREZ AMARILLO³

Centro Nacional de Biopreparados, Apartado 6048, Habana 6, Cuba, Fax 338439,¹
Hospital Pediátrico "Leonor Pérez", Boyeros, Ciudad Habana, Cuba.²
Hospital Pediátrico "Juan Manuel Márquez", Marianao, Ciudad Habana, Cuba.³

*Autor para la correspondencia: E mail claudio@biocen.colombus.cu

ABSTRACT. In the last few years, the use of chromogenic and fluorogenic reactions for the identification of the most important pathogens in human urinary tract infections has become a powerful tool in clinic diagnostic. The study was carry out in two hospitals in Havana City, comparing the performance of experimental medium with the traditional one: C.L.E.D. Medium produced by Centro Nacional de Biopreparados (BIOCEN). Additional biochemical test were applied (indole, motility, citrate, H₂S glucose and lactose) for the more accurate identification of different strains. During the test 119 positive samples were evaluated with 82 identified as *E. coli* (68.9 %). As coliforms 18 samples (15.1 %) were identify without any biochemical test. The diagnostic sensitivity was 100 % and diagnostic specificity of new medium was of 97.4 % for all assayed samples.

Key words: Chromogenic-Fluorogenic Medium, Coliforms, *Escherichia coli*.

RESUMEN. La utilización de reacciones cromogénicas y fluorogénicas en la identificación de los principales patógenos urinarios ha sido, en los últimos años, un potente instrumento en el diagnóstico clínico. El objetivo del trabajo consistió en evaluar, en dos hospitales pediátricos de Ciudad Habana, un medio cromogénico-fluorogénico para *E. coli* y coliformes, producido en el Centro Nacional de Biopreparados (BIOCEN), en el diagnóstico de sepsis urinarias, así como, su comparación con los métodos y medios tradicionales de identificación. Como control se utilizó el Medio C.L.E.D. (BIOCEN), se realizaron un conjunto de pruebas bioquímicas de identificación para todas las muestras (indol, movilidad, crecimiento en citrato, producción de H₂S, fermentación de la glucosa y lactosa). Se evaluaron un total de 119 muestras, de las cuales resultaron identificadas como *E. coli* 82 (68.9 %) y como coliformes 18 muestras (15.1 %). Se identificó el principal patógeno urinario sin necesidad de pruebas bioquímicas. La sensibilidad diagnóstica resultó ser del 100 % y la especificidad diagnóstica del 97.4 %.

Palabras clave: Medio Chromogenico-Fluorogenico, Coliformes, *Escherichia coli*.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad se han desarrollado nuevos métodos y técnicas para la detección y diferenciación de bacterias, las cuales están basadas en la utilización de medios con sustratos cromogénicos y fluorogénicos. El diagnóstico con dichos medios está basado en la detección de una reacción de color o fluorescencia, de una actividad enzimática propia de un microorganismo o grupo de ellos.^{2,9} El diagnóstico de sepsis urinaria ha sido, por muchos años, uno de los ensayos realizados con más frecuencia en los laboratorios de microbiología clínica, por lo que la precisión y rapidez del método utilizado es de vital importancia. Desde los años 60, ya se reportaba la creación de sistemas para lograr un diagnóstico rápido y preciso de los principales patógenos urinarios, destacándose el sistema VITEC, el cual está ba-

sado en la degradación de diferentes sustratos y se ha perfeccionado a medida que han pasado los años.¹⁰

En este tipo de sepsis se aíslan con mucha frecuencia las enterobacterias y específicamente *E. coli* y coliformes, además de Enterococos, Estafilococos y otras enterobacterias.^{4-7,16}

Los medios cromogénicos y fluorogénicos han sido utilizados en el diagnóstico de sepsis urinarias en los últimos años reportando grandes ventajas en cuanto a rapidez y precisión de la identificación.^{3,5,12,13,16} Medios como Chromagar ORIENTATION (BBL), y CPS ID2 (bioMérieux) basados en reacciones cromogénicas han sido evaluados, logrando identificar con precisión un gran número de patógenos urinarios, mostrando evidentes ventajas respecto a los medios tradicionales.^{5,12}

La detección de *E. coli* representa del 60 al 70 % de los



resultados del análisis microbiológico de las sepsis urinarias,^{3,7,8,11} por lo que la identificación precisa de este patógeno mediante la detección de actividades enzimáticas específicas (β -galactosidasa y β -glucuronidasa),^{9,15} así como, la detección de otros coliformes es de especial aplicación en esta parte de la microbiología clínica.

El objetivo del trabajo consiste en la evaluación comparativa de un medio cromogénico-fluorogénico (CROMOCEN CC) para la identificación de *E. coli* y coliformes en muestras de orina procedentes de niños, con vistas a lograr una identificación más precisa y rápida de estos microorganismos, causantes de la mayoría de las sepsis urinarias.

MATERIALES Y MÉTODOS

El medio cromogénico-fluorogénico utilizado en la evaluación fue el CROMOCEN CC (lote 9P1), como referencia se utilizó el medio C.L.E.D. (lote 7502), ambos productos fueron producidos por BIOCEN. Las placas preparadas con los medios de cultivo se inocularon con 5 μ L de orina, la cual se esparció por la superficie con una espátula de Drigalski. Se tomó como criterio para escoger las muestras positivas un mínimo de 10^5 UFC/ml.^{1,3,14,16} Se inocularon, para cada muestra, 2 placas en paralelo, una con el medio C.L.E.D. y otra con el medio cromogénico, se incubaron a 37°C de 18 a 24 h. Se observó el color y morfología de las colonias, así como se realizó el recuento de UFC/ml y la identificación presuntiva del germen aislado.

La presencia de *E. coli* en el medio se detectó por la aparición de colonias de color azul que fluorescen en presencia de luz ultravioleta (365 nm), los coliformes se diferencian por el color azul de las colonias no fluorescentes.

Para la identificación se realizaron un conjunto de pruebas bioquímicas: producción de indol, movilidad, utilización de citrato, producción de H₂S, fermentación de la glucosa y lactosa., utilización de urea, utilización de fenilalanina.

Se determinó la sensibilidad diagnóstica (Sd) y la especificidad (Ed) por las siguientes relaciones:

$$Sd = \frac{VP}{VP + FN} \times 100$$

donde, VP: número de verdaderos positivos; FN, número de falsos negativos

$$Ed = \frac{VN}{VN + FP} \times 100$$

donde: VN: número de verdaderos negativos; FP, número de falsos positivos

RESULTADOS

Se encontraron durante el mes evaluado un total de 78 muestras de pacientes con sepsis urinaria en el primer hospital (Juan M. Márquez) y 41, en el segundo hospital (Leonor Pérez), para un total de 119. Los resultados obtenidos después de la identificación con el medio CROMOCEN CC de los patógenos en las muestras de pacientes con sepsis urinaria se muestra de forma separada para cada hospital en las tablas 1 y 2.

En la tabla 3 se encuentran los microorganismos identificados en ambos hospitales después de realizar las pruebas bioquímicas correspondientes.

DISCUSIÓN

El medio cromogénico CC permite llegar a los resultados de las tablas 1 y 2 sin necesidad de alguna prueba bioquímica adicional. Utilizando solamente el Medio C.L.E.D., no fue tener certeza en la identificación de *E. coli*, debido a la posibilidad de confundirse con otros coliformes, siendo este un elemento muy importante en el diagnóstico de sepsis urinaria donde, según la literatura, en alrededor del 70 % de los casos, el patógeno aislado es *E. coli*, lo cual se corresponde plenamente con los resultados obtenidos en este trabajo (68,9 % de *E. coli*).

Según dichos resultados sería necesario recurrir a pruebas bioquímicas de identificación solamente en alrededor de un 30 % de los casos, lo que ahorra un tiempo de, al

Tabla 1. Patógenos identificados y prevalencia de éstos en el hospital "Juan M. Márquez"

Microorganismo	No. de muestras positivas	Prevalencia, %
Escherichia coli	53	67.9
Coliformes	14	18.0
Otras bacterias	11	14.1
Total	78	100

Tabla 2. Patógenos identificados y prevalencia de éstos en

Microorganismo	No. de muestras positivas	Prevalencia, %
Escherichia coli	29	70,7
Coliformes	4	9,8
Otras bacterias	8	19,5
Total	41	100

Tabla 3. Caracterización bioquímica de los microorganismos y comparación de las características en los medios C.L.E.D. y CROMOCEN CC.

Microorganismo identificado	Color de las colonias (CC)	Fluorescencia (CC)	Color de las colonias C.L.E.D	Mov.	Indol	Fenil-alanina	Citrato	Urea	Kligler			
									Gluc.	Lact.	Gas	H ₂ S
<i>Escherichia coli</i>	azul	+	amarillas	-	+	-	-	-	+	+	+	-
<i>Proteus sp.</i>	incoloro	-	azuloso	+	-	+	+	+	+	-	+	+
<i>Klebsiella sp.</i>	azul	.*	amarillo	-	+	-	+	+	+	+	+	-
<i>Citrobacter sp.</i>	azul	-	amarillo	-	-	-	-	+	+	±**	+	-
<i>Serratia sp.</i>	azul	-	amarillo	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Providencia</i>	incoloro	-	azuloso	+	+	+	+	+	+	-	+	-
<i>Pseudomonas sp.</i>	incoloro	-	azulosa	+	-	-	+	-	-	-	-	-

* Se encontró una cepa fluorescente

** Esta respuesta es variable para las cepas identificadas

Tabla 4. Incidencia de los patógenos identificados por pruebas bioquímicas.

Microorganismo	No. de muestras positivas	Incidencia, %
<i>Escherichia coli</i>	82	68,9
<i>Citrobacter sp.</i>	7	5,9
<i>Proteus sp.</i>	13	10,9
<i>Providencia sp.</i>	1	0,8
<i>Pseudomonas</i>	2	1,7
<i>Klebsiella sp.</i>	9	7,6
<i>Serratia sp.</i>	2	1,7
Gram positivos	3	2,5
Total	119	100

menos, 24 h adicionales.

Se observó una incidencia alta de las sepsis provocadas por *Proteus* en las muestras de pacientes pediátricos analizados, lo que sería interesante continuar evaluando con un mayor número de muestras. Los coliformes con mayor incidencia, después de *E. coli*, fueron los del género *Klebsiella* (7.6%). Las especies de *Citrobacter* (5.9%) se observaron en el medio cromogénico con una coloración azul lo que los identificó como coliformes a diferencia de lo observado en C.L.E.D, donde este microorganismo a las 24 h no aparece coloreado de amarillo ya que es fermentador

tardío de lactosa. En el medio cromogénico no hubo esta limitación, debido a que el *Citrobacter* es productor de la enzima β -galactosidasa y se comporta como coliforme en este medio.

La facilidad en la observación de los resultados en este medio cromogénico es un elemento importante que permite la interpretación correcta por personal con mínimo entrenamiento.

No se encontraron falsos negativos después de la identificación por lo que la sensibilidad diagnóstica resultó del 100 %. Se observó fluorescencia en una cepa de *Klebsiella* por lo que se consideró como un falso positivo, la especificidad diagnóstica en el medio resultó ser del 97.4 %.

REFERENCIAS

1. Acar, J. 1992. Discussion of E. W. Stam's Presentation J. Infect. 20:161.
2. Bascomb, S. 1987. Enzyme tests in bacterial identification. Methods Microbiol. 19:105-160.
3. Batchelor, B. I. F. 1995. Identification of urinary pathogens by RAPIDEC system. J. Med. Microbiol. 43:72-74.
4. Frampton, E. W., L. Restaino y N. Blaszko. 1988. Evaluation of the β -glucuronidase substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-Gluc) in a 24 hour. Direct Plating Method for *Escherichia coli*. J. Food Protection. 51:402-404.
5. Hengstler, K., R. Hammann. y A. M. Fahr. 1997. Evaluation of BBL CHROMagar orientation medium for detection and presumptive identification of urinary tract pathogens. J. Clin. Microbiol. 35:2773-2777.
6. Henrichsen, C. 1986. Rapid Presumptive Identification



- of *Escherichia coli* from urine samples: A simple direct plating method. *Med. Lab. Sci.* 43:2-8.
7. Kodaka, H., M. Ishikawa, M. Iwata, F. Kashitani, S. Miznochi y K. Yamaguchi. 1995. Evaluation of new medium with chromogenic substrates for members of the family *Enterobacteriaceae* in urine samples. *J. Clin. Microbiol.* 33:199-201.
 8. Lye, W. C., R. K. T. Chan, E. J. C. Lee y G. Kumarasingh. 1992. Urinary tract infections in patients with diabetes mellitus. *J. Infect.* 24:169-174.
 9. Manafi, M., W. Kneifel y S. Bascomb. 1991. Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. *Microbiol. Rev.* 55:335-348.
 10. Olson, W. P. 1996. Automated microbial identification and quantitation. *Technologies for the 2000s.* p. 53-58. Interpharm Press, Inc. USA.
 11. Pappas, P. G. 1991. Laboratory in the diagnosis and management of urinary tract infections. *Med. Clin. North Am.* 75:313-325.
 12. Reisner, B. S. y E. F. Austin. 1997. Evaluation of CPSID2 chromogenic agar as a single medium for urine culture. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 28:113.
 13. Samra, Z., M. Heifetz, J. Talmor, E. Bain y J. Bahar. 1998. Evaluation of use of a new chromogenic agar in detection of urinary tract pathogens. *J. Clin. Microbiol.* 36:990-994.
 14. Stamm, W. E. 1992. Criteria for the diagnosis of urinary tract infection and for the assessment of therapeutic effectiveness. *J. Infect.* 20:151.
 15. Tryland, Y. y L. Fiksdal 1998. Enzyme characteristics of beta-D-galactosidase and beta-D-glucuronidase-positive bacteria and their interference in rapid methods for detection of waterborne coliforms and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1018-1023.
 16. Willinger, B. y M. Manafi. 1995. Evaluation of a new chromogenic agar medium for the identification of urinary tract pathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* 20:300-302.