

Utilidad del medio cromogénico MPO® en el procesamiento habitual del urocultivo

Elena Palacios, Javier Rodríguez-Granjer, Antonio Sampedro, Antonio Martínez-Brocal y Manuel de la Rosa-Fraile

Servicio de Microbiología. Hospital Virgen de las Nieves. Granada. España.

FUNDAMENTOS. Evaluación del medio cromogénico MPO® frente al medio CLED (cisteína, lactosa, deficiente en electrolitos) respecto a su utilidad en la detección, enumeración e identificación de patógenos del tracto urinario.

MÉTODOS. Se han estudiado 1.080 muestras de orina a las que se les efectuó urocultivo en MPO® y CLED empleando el método del asa calibrada.

RESULTADOS. A partir de 145 muestras de orina positivas se aislaron 171 cepas bacterianas (*Escherichia coli*, 111; *Enterococcus* spp., 26; *Proteus* spp., 12; *Enterobacteriaceae* del grupo *Klebsiella-Enterobacter-Serratia*, 10; *Pseudomonas aeruginosa*, 5; *Streptococcus agalactiae*, 4; *Staphylococcus* spp., 3, y *Candida albicans*, 4. Los resultados de los recuentos y los tipos de microorganismos aislados fueron análogos en ambos medios, aunque en 6 casos la presencia de *Enterococcus* spp. sólo se detectó en el medio cromogénico.

CONCLUSIONES. El medio MPO® para la realización del urocultivo ofrece resultados análogos al CLED y su utilización lleva a una importante disminución de la carga de trabajo asociada a la realización de esta técnica. Este ahorro de trabajo se debe a que en la mayoría de los casos es posible obviar la realización de pruebas complementarias para la identificación de los microorganismos aislados a partir de muestras de orina.

Palabras clave: Urocultivo. Medios cromogénicos. MPO®.

Use of MPO® chromogenic culture medium for routine processing of urine cultures

BACKGROUND. The chromogenic culture medium, MPO®, was compared to culture on CLED (cystein, lactose, electrolyte-deficient) agar for the detection, enumeration and identification of urinary tract pathogens.

METHODS. A total of 1,080 clinical urine specimens were assessed. All samples were inoculated in MPO® and CLED using the calibrated loop method.

RESULTS: Among 145 positive urine samples, 171 strains of bacteria were isolated (111 *Escherichia coli*, 26 *Enterococcus* spp., 12 *Proteus* spp., 10 *Enterobacteriaceae* from the *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* group, 5 *Pseudomonas aeruginosa*, 4 *Streptococcus agalactiae*, 3 *Staphylococcus* spp. and 4 *Candida albicans*. For all samples, enumeration of microorganisms was comparable with the two media studied. Identification was also similar, except for 6 cases in which *Enterococcus* spp. were only detected with the chromogenic medium.

CONCLUSIONS. Overall urine culture results with MPO® chromogenic medium were similar to those obtained with CLED, making it a feasible alternative to the standard medium. Moreover, use of a chromogenic technique implies a significant reduction in workload, since additional tests to identify the microorganisms isolated are not needed in most cases.

Key words: Urine culture. Chromogenic media. MPO®.

Introducción

La infección del tracto urinario (ITU) constituye una de las causas más comunes de consulta médica¹, lo cual, junto al incremento de resistencia a los antimicrobianos observada entre los uropatógenos comunes, demanda la realización sistemática de urocultivos para establecer el microorganismo causante y efectuar el estudio de susceptibilidad a antimicrobianos. Por ello, los urocultivos representan hoy una importante carga de trabajo en los laboratorios de microbiología clínica².

Como medios de cultivo para realización del cultivo de orina se han aconsejado agar sangre y MacConkey³. En Europa está más extendida la utilización del medio CLED (cisteína, lactosa, deficiente en electrolitos)^{4,5}.

Los medios de cultivo diferenciales (p. ej., CLED o MacConkey) detectan caracteres fenotípicos bacterianos que ponen de manifiesto la presencia de enzimas características de grupos taxonómicos y orientan hacia la identificación presuntiva de las colonias bacterianas desarrolladas en ellos, aunque la identificación definitiva de cada colonia suele requerir su aislamiento y la realización de pruebas bioquímicas adicionales. En los últimos años se han producido avances significativos en la formulación de medios de cultivos diferenciales con la aparición de los medios cromogénicos y fluorogénicos. Estos medios incluyen en su composición compuestos cromogénicos o fluorogénicos (incoloros o débilmente coloreados y no fluorescentes) que son sustratos de

Correspondencia: Dr. M. de la Rosa-Fraile.
Servicio de Microbiología. Hospital Virgen de las Nieves.
18014 Granada. España.
Correo electrónico: delarosa@cica.es

Manuscrito recibido el 26-04-2002; aceptado el 15-06-2002.

enzimas específicas. Cuando la enzima actúa sobre el sustrato cromogénico o fluorogénico, éste sufre un cambio de estructura formándose una nueva estructura molecular coloreada o fluorescente. Los sustratos cromogénicos cuando son transformados por acción de su enzima específica cambian de color debido a la transformación química de la parte cromogénica que cambia de estructura, produciendo un cromóforo (estructura química responsable del color) coloreado⁶⁻⁸. La interacción entre los microorganismos y los sustratos cromogénicos depende del tipo del sustrato usado, pues la sustancia coloreada producida puede quedar absorbida en el interior de la célula bacteriana coloreando la colonia o difundir en el medio de cultivo produciendo un cambio de color en éste⁷.

Hoy se dispone de diversos sustratos cromogénicos (habitualmente derivados halogenados del indoxilo) que cuando son alterados por sus enzimas específicas desarrollan coloraciones distintas. Si en un mismo medio se combinan varios de estos sustratos es posible detectar de forma simultánea diversas actividades enzimáticas y llegar directamente (o tras efectuar sobre la colonia otras pruebas bioquímicas rápidas) a una identificación presuntiva de las colonias bacterianas sin necesidad de subcultivar y realizar pruebas bioquímicas adicionales.

Entre las bacterias más comúnmente aisladas en las ITU se encuentran *Escherichia coli*, otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y *Enterococcus* spp.^{2,9}. Por ello, idealmente, los medios para urocultivo deben permitir la identificación directa de estas bacterias y el crecimiento de los restantes uropatógenos que no sean identificados directamente por su crecimiento como colonias típicas en el medio usado (p. ej., *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp. y *Streptococcus* spp.) de manera que puedan ser subcultivados para su identificación posterior.

En los medios cromogénicos para urocultivo se pone directamente de manifiesto en las colonias actividad β -glucosidasa y β -glucuronidasa¹⁰ pudiéndose estudiar directamente sobre las colonias aisladas la detección de indol y la presencia de actividad triptófano desaminasa¹⁰. La detección de estas actividades enzimáticas, junto con la morfología colonial, permite reconocer presuntivamente *E. coli* (glucuronidasa positivo, indol positivo), el grupo *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* (glucosidasa positivo), *Enterococcus* spp. (glucosidasa positivo) y el grupo *Proteus-Morganella-Providencia* (triptófano desaminasa positivo) incluyendo *Proteus vulgaris* (indol positivo)^{6,7}.

El objetivo de este trabajo es evaluar la efectividad en la práctica en un laboratorio de microbiología clínica de un medio comercial cromogénico para orinas el MPO® (Biomedics, Tres Cantos, Madrid) comparándolo con uno de los medios más habituales para urocultivo, el medio CLED.

Material y métodos

Muestras

Se han estudiado 1.080 muestras de orina remitidas sucesivamente a nuestro laboratorio para estudio microbiológico, durante un período de 15 días.

Tras homogenización por agitación las orinas se inocularon (antes de 1 h de su llegada al laboratorio) con asa calibrada de 1 μl ³ en paralelo en el medio cromogénico MPO® y en CLED. La lectura de las placas se realizó tras 18 h de incubación a 36 °C en aerobiosis. A todas

las muestras de orina se les realizó estudio microscópico para observación de leucocitos y células epiteliales mediante la técnica de microscopía invertida en placa microtiter¹¹. Las muestras con presencia de células epiteliales y sin presencia de leucocitos se descartaron como muestras posiblemente contaminadas.

Medios de cultivo

El medio CLED se preparó en el laboratorio a partir de medio base deshidratado (Oxoid Ltd., Basinsgate, Reino Unido) siguiendo las instrucciones del fabricante. El medio MPO® fue adquirido como placas preparadas por Biomedics.

Interpretación de los cultivos

La interpretación de los recuentos de colonias se realizó según criterios establecidos³, considerándose positivos los recuentos superiores a 10.000 bacterias/ml. Aquellas muestras en que crecieron tres o más microorganismos se consideraron contaminadas y no se incluyeron. *S. agalactiae* y la presencia de levaduras se consideró criterio de positividad independientemente del número de colonias encontradas.

Identificación bacteriana

Las colonias aisladas en medio CLED se identificaron por pruebas bioquímicas convencionales¹² y, en caso de resultados dudosos, se utilizaron paneles API (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia). La identificación de las colonias crecidas en el medio cromogénico se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (morfología colonial, detección directa por coloración de β -glucuronidasa y β -glucosidasa y por técnicas rápidas de indol (cinamaldehído), triptofanodesaminasa (cloruro férrico) y oxidasa. Las colonias puntiformes que presentaban coloración azul (β -glucosidasa positiva) se consideraron *Enterococcus* spp. Las colonias puntiformes incoloras o color azul débil se subcultivarón a medio Granada (Biomedics)¹³ para la detección de *S. agalactiae*.

Resultados

De las 1.080 pruebas de orina recibidas para urocultivo se obtuvieron 165 cepas bacterianas, procedentes de 145 orinas a partir de los cultivos positivos en CLED. De ellas, 111 fueron *E. coli*; 20, *Enterococcus* spp.; 10, *Proteus* spp.; 2, *Proteus* spp. indol positivo; 10, *Enterobacteriaceae* del grupo *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* (5, *K. pneumoniae*; 1, *E. cloacae*; 2, *E. aerogenes*, y 2, *S. marcescens*); 5, *P. aeruginosa*; 4, *S. agalactiae*; 2, *S. epidermidis*, y 1, *S. aureus*. Así mismo fueron aisladas 4 cepas de *Candida albicans*. En 6 casos se detectaron *Enterococcus* spp. en el medio cromogénico que no se observaron en CLED.

En todos los casos se obtuvieron recuentos análogos de UFC/ml en el medio cromogénico y en el CLED. El medio MPO® permitió la identificación directa de 102 de los 111 aislados de *E. coli*, e identificó directamente los 20 aislados de *Enterococcus* spp. y los 12 de *Proteus* spp. La impresión general fue que los cambios de color que desarrollan las colonias en el medio cromogénico eran claros y fáciles de observar, incluso en presencia de otras especies bacterianas, sobre todo en el caso de *Enterococcus* spp. Esto explica por qué aumenta la observación de *Enterococcus* spp. en el medio cromogénico respecto al CLED.

En todos los casos las cepas de *Enterococcus* spp. presentaron actividad glucosidasa y colonias puntiformes, siendo su detección muy clara en MPO, pues en este medio las cepas de *Enterococcus* spp. producen un halo de difusión de pigmento alrededor de la colonia puntiforme.

Todos los *Proteus* spp. se identificaron directamente en el MPO® y presentaban colonias translúcidas que producen un

ligero oscurecimiento del medio y que al añadir cloruro férrico adoptan una coloración marrón-violeta (triptófano desaminasa positiva).

Las 5 cepas de *P. aeruginosa* mostraron colonias de morfología irregular y reacción de oxidasa positiva. Las dos de *S. epidermidis* y una de *S. aureus* aislado se identificaron fácilmente por la morfología al Gram, actividad catalasa y coagulasa. Los 4 aislados de *S. agalactiae* se mostraron a las 18 h como colonias puntiformes, que se distinguían mejor con ayuda de la lupa y que al resembrarse en medio Granada mostraron el pigmento rojo-naranja característico. Las 4 cepas de *C. albicans* fueron detectadas por su morfología colonial, tinción de Gram y producción de tubos germinales.

En el medio cromogénico se observaron 6 cultivos mixtos de *E. coli* y *Enterococcus* spp. que pasaron inadvertidos en el CLED.

Discusión

El agar sangre se considera el medio óptimo para el aislamiento y recuento de bacterias en orina³, pero permite muy poca diferenciación entre los microorganismos recuperados y falla completamente cuando crecen especies de *Proteus* invasores. El CLED y el medio MacConkey impiden la invasión por *Proteus* spp., pero su capacidad diferencial es pequeña, pues sólo distingue las colonias lactosa fermentadoras de las no fermentadoras. En los medios cromogénicos que utilizan sustratos con derivados de indoxilo lo que aparece coloreado es la colonia (por precipitación en el interior del microorganismo del cromóforo formado por oxidación del indoxilo liberado a partir del sustrato cromogénico por acción de la enzima) y no el medio, y por ello detectan cultivos mixtos, incluso cuando alguna de las bacterias que participa en el cultivo mixto aparece en poca cantidad⁶ como es frecuente en muestras de orina con desarrollo mixto de *Enterococcus* spp. y *E. coli*¹⁴.

En nuestro estudio, el medio cromogénico MPO® ha permitido el crecimiento de todos los uropatógenos aislados en CLED, lo cual sugiere que puede ser utilizado como medio único para el cultivo de orina.

La principal aportación de los medios cromogénicos al urocultivo es la detección directa simultánea de varias actividades enzimáticas en un mismo medio, lo que permite la identificación presuntiva directa (o con un mínimo de pruebas adicionales) de la mayoría de las bacterias uropatógenas. Esto lleva a una importante disminución de la carga de trabajo asociada al procesamiento de los urocultivos¹⁴⁻¹⁶. Así mismo, los resultados que se obtienen en identificación presuntiva de las bacterias en los medios cromogénicos no presenta diferencia con la realizada por técnicas bioquímicas convencionales¹⁷.

Hay que tener en cuenta que el uso de estos medios en los laboratorios de microbiología clínica introduce cambios en los criterios de identificación de los uropatógenos (que son identificados directamente), lo que debe considerarse en las comparaciones con estudios previos.

Así mismo, la capacidad de los medios cromogénicos para detectar la presencia de cultivos mixtos, presencia que cuando se utilizan medios convencionales pasa desapercibida^{6,14}, puede hacer necesario reevaluar los criterios comúnmente aceptados³ para reconocer un cultivo mixto como indicativo de infección urinaria.

Debe señalarse que las colonias bacterianas coloreadas en los medios cromogénicos que utilizan sustratos derivados de indoxilo están constituidas por bacterias que retienen en su interior el cromóforo insoluble. Este hecho no parece influir en los

resultados de los tests de sensibilidad antibiótica realizados por el método de difusión a partir de subcultivos de estas colonias¹⁵. Sin embargo, si sería necesario estudiar las posibles interferencias que la presencia residual de cromóforos en estas bacterias puede ocasionar cuando se utilizan sistemas de identificación bacteriana basados en la detección de enzimas preformadas, como ocurre en algunos de los nuevos sistemas automáticos de identificación que requieren el uso de altos inóculos bacterianos¹⁸, pues la intensa coloración del inóculo puede potencialmente interferir con la lectura de las reacciones bioquímicas en estos instrumentos.

En conclusión, el medio cromogénico evaluado (MPO®) para urocultivo constituye una opción atractiva y válida para los laboratorios de microbiología clínica, pues permite afrontar con más facilidad la carga de trabajo que representa el procesamiento diario de gran cantidad de urocultivos.

Bibliografía

- Hooton TM. Pathogenesis of urinary tract infections: An update. *J Antimicrob Chemother* 2000;46(Suppl 1):1-7.
- Bouza E, San Juan R, Munoz P, Voss A, Kluytmans J, Co-operative Group of the European Study Group on Nosocomial Infections. A European perspective on nosocomial urinary tract infections I. Report on the microbiology workload, etiology and antimicrobial susceptibility (ESGNI-003 study). European Study Group on Nosocomial Infections. *Clin Microbiol Infect* 2001;7:523-31.
- Reisner BS, Woods GL, Thomson RB, Larone DH, Garcia LS, Shimuzu RT. Specimen Processing. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaffer MA, Tenover FC, Yolken RH, editors. *Manual of clinical microbiology*, 7^a ed. Washington: ASM Press, 1999; p. 64-104.
- MacKey JP, Sandys GH. Diagnosis of urinary tract infections. *BMJ* 1966;1:1173-4.
- Munoz P, Cercenado E, Rodriguez-Creixems M, Diaz MD, Vicente T, Bouza E. The CLED agar option in urine culture routine. A prospective and comparative evaluation. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1992;15:287-90.
- Manafi M, Kneifel W, Bascomb S. Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. *Microbiol Rev* 1991;55:335-48.
- Manafi M. Fluorogenic and chromogenic enzyme substrates in culture media and identification tests. *Int J Food Microbiology* 1996;31:45-8.
- Manafi M. New development in chromogenic and fluorogenic culture media. *Int J Food Microbiology* 2000;60:205-18.
- Navarro F, Fuentes I, Izquierdo C, Sánchez F, Prats G. Evaluación del medio cromogénico ID2 (BioMerieux) en urinocultivos. *Enferm Infect Microbiol Clin* 1996;14:215-9.
- Doleans F. A new approach in bacteriology with chromogenic media. *Microbiología SEM* 1994;10:195-202.
- Maskell R. Urinary tract infection in clinical and laboratory practice. London: Edward Arnold, 1988.
- Murray PR, Baron EJ, Pfaffer MA, Tenover FC, Yolken RH, editors. *Manual of Clinical Microbiology*, 7^a ed. Washington: ASM Press, 1999.
- Rosa M, Perez M, Carazo C, Peis JJ, Pareja L, Hernandez L. New Granada Medium for detection and identification of group B streptococci. *J Clin Microbiol* 1992;30:1019-21.
- Hengstler KA, Hammann R, Fahr AM. Evaluation of BBL CHROMagar orientation medium for detection and presumptive identification of urinary tract pathogens. *J Clin Microbiol* 1997;35:2773-7.
- Samra Z, Heifetz M, Talmor J, Bain E, Bahar J. Evaluation of use of a new chromogenic agar in detection of urinary tract pathogens. *J Clin Microbiol* 1998;36:990-4.
- Aspevall O, Osterman B, Dittmer R, Sten L, Lindback E, Forsum U. Performance of four chromogenic urine culture media after one or two days of incubation compared with reference media. *J Clin Microbiol* 2002;40:1500-3.
- Mazoyer MA, Orenga S, Doleans F, Freney J. Evaluation of CPS ID2 medium for detection of urinary tract bacterial isolates in specimens from a rehabilitation center. *J Clin Microbiol* 1995;33:1025-7.
- Miller JM, O'Hara C. Manual and automated systems for microbial identification. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaffer MA, Tenover FC, Yolken RH, editors. *Manual of clinical microbiology*, 7^a ed. Washington: ASM Press, 1999; p. 193-201.