

La Coloración de Gram en el Diagnóstico de la Infección Urinaria

Alba Lucía ARAMBULA DE OBREGÓN^[1]

El propósito de este estudio, fue validar la coloración de Gram de la orina centrifugada con el método de cultivo cuantitativo con recuento de 10^5 unidades formadoras de colonia (UFC) / mL de orina, como prueba de referencia o "gold standar", en muestras de personas a quienes se les solicitó urocultivo, para investigación de Infección del Tracto Urinario (ITU) en el Laboratorio Clínico de la Escuela de Bacteriología, Facultad de Salud de la UIS; el cual se realizó a partir de 601 muestras, en el periodo comprendido entre Enero del 2.001 a Marzo del 2.003. Las orinas se centrifugaron y el sedimento coloreado con Gram fue analizado microscópicamente, las muestras que presentaban bacterias fueron cultivadas en medios selectivos de acuerdo con la morfología y la tinción observada, aquellas en las que no se observaron bacterias no se cultivaron en ningún medio, pero si se hizo el recuento de bacterias. Mediante la coloración de Gram se encontró que de las 601 muestras analizadas, se obtuvo 165 (27.4%) positivas para bacterias de las cuales 149 (90.3%) mostraron bacilos Gram negativos, mientras solo 16 (9.7 %) presentaban cocos Gram positivos. Adicionalmente 161 (26.7 %) de las muestras positivas mostraron presencia de leucocitos. El 96.3 % (155) de las muestras leucocito positivas presentaron recuentos entre 10^4 y 10^5 unidades formadora de colonia por mililitro de orina (UFC/mL.). Obteniéndose con este trabajo que la sensibilidad de 93.9 % y una especificidad de 97.7% de la coloración de Gram en orina centrifugada, dado que en 436 del total de muestras no se observó bacterias ni leucocitos por tanto sus recuentos fueron negativos y en aquellas en las que se observaron bacterias y leucocitos se obtuvieron recuentos 10^5 UFC/mL que indicaban una infección urinaria con un solo tipo de bacteria. *Salud UIS 2004;36:132-137*

Palabras claves: Infección Urinaria. Gram. Piuria. Bacteriuria

The purpose of this work was to validate the Gram stain of centrifuged urine related in front of with the bacterium count by the quantitative method, with count of bacterium = 10^5 CUF/mL of urine or "gold stand" in samples of persons from whom cultures were solicited the urine culture in the Laboratory of Clinic Escuela de Bacteriología Facultad de Salud de la UIS, the present study was carried out to determine the degree of reliability and sensitivity of the Gram method for the diagnosis of Urinary infection (UIT) beginning at the 601 samples of urine in the period understood to be between January 2001 and March 2003. The urine was centrifuged and the sediment was microscopically analyzed by Gram stain and the samples that showed bacteria were cultivated in selective mediums in accordance with the morphology and observed dyes, those in which bacteria was not observed were not cultivated by any medium, but they had a bacteria count. During the Gram stain it was found that of the 601 analyzed samples, 165 (27.4 %) showed positive for bacteria and of those 149 (90.3 %) showed Gram negative bacillus, while only 16 (9.7 %) Gram positive cocci. Additionally 161 (26.7 %) of the positive samples showed the presence of leukocytes. The 96.3 % (155) of the positive leukocyte samples showed counts between 10^4 and 10^5 UFC/mL. In conclusion this work, the sensitivity was 93.0 % and specificity 97.7% of Gram stain in centrifuged urine, given that in 436 of the total samples neither bacterias nor leukocytes were observed for as much as their counts were negative and in those that bacterias and leukocytes were observed they displayed counts of 10^5 UFC/mL that indicated a urinary infection with only one type of bacteria. *Salud UIS 2004;36:132-137*

keys words : Urinary infections. Gram. piuria. bacteriuria

INTRODUCCIÓN

La coloración de Gram, descrita desde 1884 por el médico danés Christian Gram es una coloración diferencial de uso común en Bacteriología¹. Las preparaciones sobre portaobjetos que contienen bacterias tratadas con esta coloración se pueden

clasificar en Gram positivas y Gram negativas, según retengan o no el colorante de cristal violeta después de agregar una solución decolorante, bien sea alcohol al 100% o alcohol-acetona. La captación del colorante de Gram depende en gran parte de la composición de la pared bacteriana, donde eventos físicos como solubilidad, difusión, permeabilidad y adsorción y químicos como cargas eléctricas y pH están involucrados¹. La compleja composición de la pared de las diversas especies bacterianas como ácidos teicoicos, proteínas, lípidos y aminoácidos, establece las diferencias de las reacciones observadas al Gram.

^[1] Profesora Asistente Escuela de Bacteriología Facultad de Salud UIS.

Correspondencia: Escuela de Bacteriología. Facultad de Salud. UIS. Carrera 32 # 29-31 Bucaramanga. Arambula@Uis.edu.co

Esta coloración permite visualizar la morfología y el tipo de agrupación de las bacterias como cocos en cadena o en racimo, bacilos Gram negativos o Gram positivos. Algunos de ellos, producen enfermedades localizadas o sistémicas y dentro de estas destacaremos en este manuscrito las relacionadas con las vías urinarias.

Las infecciones del tracto urinario son las más frecuentes, especialmente en niñas en edad preescolar y mujeres en edad reproductiva^{3,4}. Estas infecciones pueden ser asintomáticas o sintomáticas. Las sintomáticas tienen importancia en mujeres embarazadas y en ancianos. Las sintomáticas presentan cuadros clínicos diversos como síndrome uretral agudo, cistitis y pielonefritis⁵.

La coloración de Gram en las muestras de orina para Urocultivo permite evaluar el tipo de bacteria, la presencia de púrria y determinar si hubo una adecuada recolección de la muestra.

Las bacterias son la causa más frecuente de las infecciones urinarias, siendo las bacterias Gram negativas las más involucradas. La *Escherichia coli* produce el 90 % de las infecciones urinarias, *Enterococcus* 9%, *Staphylococcus* 2% y *Streptococcus* 2%^{6,7,8}.

En una infección urinaria es de gran importancia identificar el agente etiológico lo más pronto posible, para entablar un tratamiento oportuno, prevenir recaídas y cronicidad, evitando el daño renal que puede ser fatal para el paciente. Es importante realizar diagnóstico diferencial con otras infecciones como uretritis y vaginitis, ya que estas presentan sintomatología semejante a la infección urinaria y necesitan diferente protocolo terapéutico^{3,9}.

El presente estudio rescata la relevancia de la coloración de Gram como un método sencillo, rápido predictor de la infección urinaria. El uso de este método deberá constituirse en herramienta rutinaria como parámetro de orientación clínica, permitiendo una ventaja costo-beneficio, al servir de tamizaje de muestras que cumplen la calidad requerida para el estudio bacteriológico consecuente. Se tiene establecido que una gota de orina sin centrifugar que tenga una bacteria por campo en 100 campos con objetivo de 100X y que sea de un solo tipo se considera que equivale a 10^5 UFC^{7,14,16,18}, esto cuando se sabe que una orina está infectada, pero cuando son orinas de personas asintomáticas o que tienen bajos recuentos la mayoría de los investigadores no lo tienen en cuenta, por eso en este trabajo se realizó el Gram centrifugando la orina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio y muestra

Se analizaron 601 muestras de orina de personas adultas y niños que asistieron al Laboratorio Clínico, para practicarse un urocultivo solicitado por el médico.

Las muestras fueron recolectadas en condiciones de esterilidad, teniendo en cuenta que fuera la primera orina de la mañana previo lavado de genitales externos. La orina fue recolectada directamente en el frasco suministrado por el Laboratorio, descartando la primera y última parte de la micción y las muestras fueron entregadas antes de dos horas después de la recolección.

Procesamiento de las muestras

Urocultivo por la técnica de la dilución en tubo:

1. Estudio del Sedimento por coloración de Gram Las muestras de orina se procesaron previa homogenización de la misma. De cada muestra se tomó una alícuota de 10 mL y se centrifugó a 3.500 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y realizó la coloración de Gram del sedimento obtenido.
2. Cultivo del sedimento: se hicieron cultivos a partir de los sedimentos que exhibían bacterias de un solo tipo de morfología y tinción: en Agar Sangre, si se observaban cocos Gram positivos y en Agar MacConkey, si se observaban bacilos Gram. Si en la muestra se observaba biota variada (lactobacilos, cocos gram positivos, bacilos gram positivos del tipo *Corynebacterium*, diplococos gram negativos y bacilos gram negativos) no se cultivaba y se solicitaba nueva muestra.
3. El recuento de bacterias, se preparaba una dilución 1:100 posteriormente se sembraba 1 mL de esta dilución en caja de petri estéril y luego se agregaba 25 mL de agar de recuento previamente fundido a 45 grados, se mezclaba por rotación y se dejaba solidificar, para luego incubarse a 35-37°C por 24 horas.

A cada sedimento se practicó en lámina portaobjetos por triplicado.

Los resultados se analizaron estadísticamente utilizando una base de datos en Epi-info 6.0. Se determinó la sensibilidad y especificidad del Gram, utilizando la tabla del dos por dos.

RESULTADOS

De las 601 muestras cuyos sedimentos obtenidos fueron coloreados con Gram, en 165 (27.4%) se observaron bacterias, de las cuales el 96.3% (155/165) registró

recuento = 10^5 UFC/mL. Tabla 1. así mismo los leucocitos se hicieron presentes en el 97.6 % de estas (161/165) ; destacándose que en un 46 % de las muestras correspondían a la presencia de menos de 5 leucocitos por campo. Tabla 2.

Gram del sedimento	No de muestras	%	Muestras con $\geq 10^5$ UFC/mL	%	Muestras con $< 10^5$ UFC/mL	%
Con bacterias	165	27.4	155	96.3	10	6.1
Sin bacterias	436	72.5	0	0	0	0
Total	601	99.9	155	96.3	10	6.1

Tabla 1. Recuento de UFC/mL en muestras positivas para bacterias al Gram.

El 97.6% (155/165) de las muestras con bacterias al Gram y recuentos = 10^5 UFC/mL de orina presentaron leucocitos identificados en el sedimento urinario coloreado indicando así la presencia de infección urinaria. Table 2,

Recuento de bacterias	n	%	Leucocitos	n	%
$\geq 10^5$ UFC/mL	155	96.3	presencia	161	97.6
$< 10^5$ UFC/mL	10	1.66	presencia	6	0.27
	165				

Tabla 2. UFC/mL y Leucocitos en muestras con bacterias observadas con sedimentos coloreados con Gram

Al relacionar la cantidad de leucocitos con el recuento de colonias, se observó que cerca del 40% (74) correspondía a menos de 5 leucocitos por campo, seguramente al concentrar la orina por centrifugación permite visualizar los leucocitos si estos se encuentran en escasa cantidad. Tabla 3

Cantidad de leucocitos	No de muestras	%
Abundante (≥ 10)	45	27.9
Media (5 a 10)	42	26.1
Escasa (< 5)	74	46
Total	161	100

Tabla 3. Proporción en que se encontraron los leucocitos en las orinas que contenían recuentos entre = 10^5 UFC /ml

En cuanto a la etiología identificada en este estudio se observó que el 90.3% de las bacterias presentes correspondieron a bacilos Gram negativos, y la especie mas frecuente la *E. coli* en un 74 %, seguido de otros bacilos Gram negativos en un 18% y de cocos Gram positivos en 9%, en este estudio. Tabla 4.

Tipo de bacteria al Gram	N	%	Especie bacteriana	N	%
Bacilos Gram negativos	149	90.3	<i>Escherichia coli</i>	119	74
			Otros Gram negativos	28	18
			<i>Enterococcus faecalis</i>	9	6
Cocos Gram positivos	14	8.5	<i>Staphylococcus aureus</i>	3	2
			<i>Streptococcus grupo D</i>	2	1

Tabla 4. Tipos bacterianos mas frecuentes versus especies bacterianas más Frecuentes

DISCUSIÓN

Desde la década de los 80, la literatura científica ha proporcionado gran cantidad de informes, sobre diferentes métodos utilizados para evaluar una orina para diagnóstico de ITU¹⁰⁻¹¹. Estos métodos han variado desde los microscópicos, enzimáticos, fotométricos, filtración, por bioluminiscencia hasta los automatizados. Todos ellos han sido evaluados y confrontados con el método de cultivo cuantitativo, con recuento de 10^5 unidades formadoras de colonia (UFC) / mL de orina, como prueba de referencia o "gold standar"^{7,13,14,15,18}. En este trabajo la metodología que se ha querido evaluar es la coloración de Gram de las orinas centrifugada versus el método de cultivo cuantitativo, teniendo en cuenta también la presencia de leucocitos.

Pezzlo en 1.988, hizo una revisión de algunos de los métodos rápidos utilizados hasta el momento para hacer análisis de orina para detectar infección del tracto urinario, teniendo en cuenta el tiempo de detección, sensibilidad, especificidad y valor predictivo negativo para diferentes recuentos de UFC/ mL. de orina, detección de púria, costo por prueba y ventajas y limitaciones de cada método⁶. Concluyó que la metodología microscópica por coloración de Gram, es una prueba rápida y confiable en la detección de bacteriuria significativa a partir de una muestra de orina, y además la mas económica comparada con las otras metodologías^{13,14}.

Sin embargo, muchos investigadores han demostrado que cuando se han evaluado muestras de orina con recuentos menores de 10^5 UFC/ mL de orina, con la mayoría de los métodos, utilizados como son la bioluminiscencia, los fotométricos, los enzimáticos y los automatizados, los resultados no son tan favorables, debido a que muchos de ellos carecen de sensibilidad y valor predictivo negativo cuando los recuentos están bajos y adicionalmente no detectan la presencia de leucocitos¹¹.

La coloración de Gram, es una técnica que ha sido ampliamente utilizado como un estimativo de bacteriuria cuando se correlaciona con un recuento de $= 10^5$ UFC/ mililitro de orina, y a pesar de que la sensibilidad del Gram decrece en recuentos bajos, se recomienda realizarlo en orinas de pacientes asintomáticos y en aquellos en los que se sospecha una pielonefritis¹.

Jenkins y colaboradores, hicieron un estudio relacionado con la microscopía urinaria para detección de bacteriuria y encontraron una gran variación en los resultados obtenidos al Gram con muestras de orinas centrifugadas y no centrifugadas y sugirieron criterios de interpretación

en lo que corresponde a la sensibilidad y especificidad de la coloración de Gram. y concluyeron que este método aumentaba la sensibilidad de detección de bacterias hasta un 98% en recuentos iguales a $= 10^5$ UFC/mL de orina, cuando se centrifugaba la misma⁴. En este estudio de 165 (27.4%) se observaron bacterias, de las cuales el 96.3% (155/165) registró recuento $= 10^5$ UFC/mL, con una sensibilidad del 93.9% y una especificidad de 97.7%.

Pezzlo reportó una sensibilidad del 87% para una coloración de Gram de orina, sin centrifugar y la cual aumentaba hasta un 97% cuando las muestra de orina, contenían un solo tipo de bacteria⁷. Este estudio muestra que 149 de las orinas centrifugadas se observaron al Gram bacilos Gram negativos y en 14 se observaron cocos Gram positivos.

Aunque Kass reporta que la observación de una o mas bacterias por campo microscópico, con objetivo de inmersión de una gota de orina sin centrifugar coloreada con Gram, tiene una sensibilidad del 85% cuando se correlaciona con un conteo de $= 10^5$ UFC/ mL de orina. Otros como Tilton reportan una sensibilidad del 96% y Washington del 95%, con valores predictivos negativos $= 99%$ ^{11,15,16}.

Mas aún, la sensibilidad del Gram para recuentos de 10^5 UFC/mL ha sido del 95%, del 90% para recuentos de 10^4 UFC/ mL de orina y del 78% para recuentos de 10^3 UFC/ mL de orina. Y un valor predictivo negativo del 99 % para recuentos de 10^5 UFC/ mL de orina: del 94% para recuentos de 10^4 UFC/mL de orina y del 81% para recuentos de 10^3 UFC/mL de orina¹².

Su capacidad de detectar piuria y su bajo costo, hacen que la coloración de Gram, sea ampliamente utilizada por los bacteriólogos con el propósito de diferenciar una orina contaminada de una que presente una verdadera infección, cualquiera que sea el método utilizado, y sirve de guía para la detección de infecciones asintomáticas¹³. Autores como Stamm demostraron que el 90% de pacientes que presentaban cistitis con un bajo recuento de bacterias tuvieron hasta 10 leucocitos por campo. En este estudio los leucocitos se hicieron presentes en el 97.6 % de estas (161/165); destacándose que en un 46 % de las muestras correspondían a la presencia de menos de 5 leucocitos por campo. Table 3.

Robbins reporta que una gota de orina sin centrifugar que no muestre al Gram bacterias ni leucocitos es una muestra que no debe ser cultivada¹⁸. En este estudio en donde se centrifugó la orina se encontró que en 436 de las muestras no se observó al Gram ningún tipo de

bacteria y al relacionarlo con el recuento de bacterias no se obtuvo crecimiento alguno ver .Tabla 1.

Kunin y cols. mostraron la importancia de tener en cuenta las orinas con bajos recuentos de bacterias y concluyeron que podría tratarse de infecciones tempranas no establecidas todavía, o de bacterias que provenían de la uretra infectada^{3,18}. Stamm confirma estos hechos en su estudio en donde compara, los bajos recuentos de colonias tomando muestras por punción suprapúbica de estos pacientes y comprobando de esta manera que las bacterias provenían de la uretra infectada, principalmente^{15,8}. En este estudio se observó que las muestras que contenían recuento de colonias $< 10^5$ UFC/mL, mostraron bacterias al Gram y también la presencia de leucocitos como se muestra en la Tabla 2.

En la Tabla 3 se muestra que las que presentaron leucocitos no todos tenían la misma cantidad de ellos. Se ha establecido que el hallazgo de púria en la muestra de orina con objetivo de inmersión (100X) es también un parámetro importante de evaluar en una infección urinaria, y muchos de los métodos que han sido evaluados como son los automatizados no detectan leucocitos.^{1,16,18}. En este estudio el 46% (74) correspondía a menos de 5 leucocitos por campo, posiblemente se deba a la concentración por centrifugación es lo que permite visualizar los leucocitos si estos se encuentran en escasa cantidad.

Lockhart y col. en su estudio para determinar si la coloración de Gram era mas sensible que el uroanálisis, para la detección de ITU en niños lactantes, concluyó que la coloración de Gram es mas confiable debido a que tiene una sensibilidad del 94% frente a un 67% del uroanálisis y una especificidad del 92% frente a un 79% del uroanálisis⁹. En este estudio se pudo establecer una sensibilidad de 93.9% y una especificidad de 97.7%, más alta que la reportada por Lockhart².

En la Tabla 4. se muestra que los bacilos Gram negativos 74%, como la *E. coli* son los que ocupan el primer lugar como agentes etiológicos de infección urinaria, seguido de los cocos Gram positivos en una proporción mas baja 9% en este estudio realizado en el Laboratorio Clínico de la Escuela de Bacteriología.

La validez de la coloración de Gram proporciona indicadores tales como la presencia de púria y bacteriuria significativa, características morfológicas y tincionales de la bacteria implicada, información que puede ser utilizada por el médico en una terapia antibacteriana inicial, adecuada y oportuna¹³. Dado que es una ayuda

invaluable para el bacteriólogo en la selección de muestras negativas, dedicando más tiempo a las positivas, y mejorando de esta manera la eficiencia y el costo-beneficio del diagnóstico para el paciente¹³.

Teniendo en cuenta las anteriores consideraciones con respecto de la coloración de Gram, esta no se debe omitir de hacer en cualquiera de las metodologías que se utilicen en el Laboratorio para llevar a cabo la investigación de la ITU. Se debe replantear su utilización como una herramienta imprescindible en el diagnóstico presuntivo de las infecciones del tracto urinario. Valdría la pena hacer investigaciones dirigidas a su evaluación frente a otras metodologías diagnósticas utilizadas.

REFERENCIAS

- 1 Levy J, Campbell JJR, Blackburn TH. Introductory Microbiology. The University of British Columbia Vancouver. Canada .John Wiley & Sons, INC 1.975.
- 2 Lockhart GR: Lewander WJ, Cimini DM, Josephson SL, Linakis JG. Use of urinary gram stain for detection of urinary tract infection in infants. Ann Emerg Med 1.995; 25: 31-5.
- 3 Kunin CM, Polyac F, Postel E. Periurethral bacteria flora in woman prolonged intermittent colonization with *Escherichia coli*, Jama 1.980, 243 :134
- 4 Stamm WE, Counts GW., Running KR, et al. Diagnosis of coliform infection in acutely dysuric women. N Engl J Med 1.982; 307:463.
- 5 Washington JAII, White CM, Laganieri M, and Smith LH. Detection of significant bacteriuria by microscopic examination of urine. Lab Med 1.985; 12: 294-96
- 6 Schaeter, Moselio, Medoff G, y et al. Microbiología. Mecanismos de las enfermedades infecciosas. Enfoque mediante problemas. 2a. Edi. Editorial panamericana 1.994.
- 7 Stamm WE. Interpretation of urine cultures. Clin. Microbiol News 1.983. 5:15.
- 8 Sodeman T M. A practical strategy for Diagnosis of Urinary Tract Infections. Clin Lab Med 1.995 ; 2: 235-50.
- 9 Latham RH, Wong ES, Larson A, et al. Laboratory diagnosis of urinary tract infection in ambulatory women. JAMA 1.985 ; 254:3333.
- 10 Hurbult TA, Litemberg B and The diagnostic Technology Assesment Consortion. – J. Clin. Microbiol and J. Infect Diss. Artículo Original. 1.991.
- 11 Pfaller MG, Ringenberg L. Rames, Hegeman J. and Koontz F. The usefulness of screening test for pyuria in combination with culture of urinary tract infection. Diagn Microbiol. Infect Diss 1.987; 6: 207-215.

- ¹² Pezzlo M. Detection of Urinary Tract Infections by Rapid Methods. *Clin Microbiol Rev.* 988; 1:268-280
- ¹³ Pezzlo MT, Tan GL, Peterson EM, de la Maza LM. Screening of urine cultures by three automated systems. *J. Clin Microbiol* 1.982; 15: 468-74.
- ¹⁴ Jemkins RD, Fenn JP and Marsen JM. Review of urine microscopy for bacteriuria. *J Am Med Assoc.* 1.986 255: 3397-3404.
- ¹⁵ Stamm. WE. 1.983 .Medicion de piuria y su relación con bacteriuria. *Amm J Med* 1.983; 75: 53-58.
- ¹⁶ Tilton R E, and Tilton RC. Automated direct antimicrobialsusceptibility testing of mycroscopically screened urine cultures. *J. Clin. Microbiol.* 1.980 ; 11: 157-161.
- ¹⁷ Robbins, DG, Rogers KB, White RHR, and Osman MS. Urine microscopy as an aid to detection of bacteriuria. *Lancet* 1.975 1:476-478.
- ¹⁸ Kunin CM , White LV, Hua TH. A reassesment of the importance of "low-count" bacteriuria in young women with acute urinary symptoms. *Ann. Intern Med.* 1.993; 119:454.