

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**Departamento de Microbiología I**



TESIS DOCTORAL

## **Técnicas rápidas en bacteriología**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Fernando de la Torre Misiego**

DIRECTOR:

**José Bravo Oliva**

Madrid, 2015



5305328720

10R  
tec

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA  
CATEDRA DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA

TECNICAS RAPIDAS EN BACTERIOLOGIA



FERNANDO DE LA TORRE MISIEGO

R- 20.587

DIRIGIDA POR:  
PROF. JOSE BRAVO OLIVA

A mi mujer.

A mis hijos.

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento al Prof. Dr. D. José Bravo Oliva, Catedrático de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense, que tan amablemente ha aceptado la dirección de este trabajo.

Al Prof. Dr. D. Juan J. Picazo de la Garza, Catedrático de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense, por lo decisiva que ha sido su participación en este trabajo, así como por sus consejos y enseñanzas que han hecho posible esta Tesis.

A mis compañeros del Servicio de Microbiología Clínica del Hospital Clínico Universitario de Madrid, que no dudaron en ningún momento en prestarme su ayuda.

I N D I C E

I. INTRODUCCION

|  |    |
|--|----|
| I. GENERALIDADES .....   | 1  |
| II. TECNICAS QUE UTILIZAN LA VISUALIZACION DE LOS AGENTES ETIOLOGICOS....                                    | 6  |
| II.1. Tinción de Gram .....  | 8  |
| II.2. Tinción de Naranja de Acridina .....   | 9  |
| II.3. Tinción de Ziehl-Neelsen o / auramina .....  | 10 |
| II.4. Microscopio de campo oscuro .  | 11 |
| II.5. Utilidad e indicaciones del diagnóstico microscópico en distintos tipos de muestra o infecciones ..... | 11 |
| III. DETECCION DE ANTIGENOS UTILIZANDO ANTICUERPOS ESPECIFICOS.....  | 19 |
| III.1. Inmunofluorescencia directa en identificación de / bacterias .....                                    | 19 |
| III.2. Contraelectroforesis  | 27 |
| III.3. Técnicas de aglutinación .  | 30 |
| III.3.1. Aglutinación de - Látex .....   | 32 |

|   | <u>pag</u> |
|---|------------|
| III.3.2. Coaglutinación   | 33         |
| III.4. Inmunoensayo enzimático<br>(ELISA) .....   | 36         |
| IV. TÉCNICAS QUE IDENTIFICAN SUSTANCIAS<br>ELABORADAS POR EL AGENTE INFECCIO-<br>SO O DETECTAN SUSTANCIAS PRODUCI -<br>DAS POR EL HUESPED EN RESPUESTA A<br>UNA INFECCION ..... | 38         |
| IV.1. Prueba del Límulo .....   | 38         |
| IV.2. Cromatografía de gases .....  | 39         |
| IV.3. IgM específica .....  | 40         |
| V. DETECCIÓN RAPIDA DE BACTERIURIA SIG-<br>NIFICATIVA .....   | 40         |
| V.1. Bioluminiscencia .....   | 41         |
| V.2. Impedimetría .....   | 42         |
| V.3. Métodos electroquímicos y nefe-<br>lométricos .....  | 42         |
| V.4. Esterasa leucocitaria y nitri-<br>tos.....   | 43         |
| V.5. Fotometría .....   | 44         |
| VI. AUTOMATIZACION Y SEMIAUTOMATIZA -<br>cion .....   | 45         |

|  |     |
|--|-----|
| <u>II. UTILIDAD CLINICA Y PLANTEAMIENTO DEL TRABA-</u> |     |
| <u>JO</u> .....  | 48  |
| - Técnicas rápidas en infección urinaria ..            | 49  |
| - Técnicas rápidas en bacteriemia .....                | 54  |
| - Diagnóstico rápido en meningitis bacteria            |     |
| na aguda .....   | 59  |
| - Planteamiento del trabajo .....                      | 64  |
| <br>   |     |
| <u>III. MATERIAL Y METODOS</u>                         |     |
| A. TECNICAS RAPIDAS EN INFECCION URINARIA.             | 66  |
| B. TECNICAS RAPIDAS EN BACTERIEMIAS .....              | 83  |
| C. LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO .....                       | 101 |
| <br>   |     |
| <u>IV. RESULTADOS</u> .....                            | 119 |
| <br>   |     |
| <u>V. DISCUSION</u> .....                              | 159 |
| <br>   |     |
| <u>VI. CONCLUSIONES</u> .....                          | 189 |
| <br>   |     |
| <u>VII. BIBLIOGRAFIA</u> .....                         | 194 |

## I. INTRODUCCION

## I. INTRODUCCION

### I. GENERALIDADES

Mientras que los rápidos progresos en biología molecular, ingeniería genética e investigación básica en Inmunología han determinado desde hace mucho tiempo el desarrollo de técnicas rápidas de diagnóstico en la mayoría de -/ campos de la Medicina, es a partir de los años 70 (137) / cuando en Microbiología Clínica, se desarrolla un verdadero interés y esfuerzo en la investigación y aplicación de método rápidos para el diagnóstico de las enfermedades in fecciosas en el hombre.

A esta situación puede haber contribuído el descubri miento de los quimioterápicos y antibióticos, que al conse guir curaciones de las infecciones entonces existentes, al gunas veces espectaculares, hicieron disminuir momentánea - mente la importancia de la Microbiología Clínica, al pensar que se poseían armas poderosísimas a las que no podría re sistirse ninguna infección.

Sin embargo, esta situación cambió pronto debido a / una serie de factores (como la aparición de infecciones - hasta entonces desconocidas, la infección hospitalaria, -/ una cirugía agresiva que abre importantes vías de infección,

y la aparición de resistencias a los antibióticos), que -/ hacen que la Microbiología Clínica recupere su protagonismo.

Esto, unido por un lado a la gravedad de gran número de enfermedades infecciosas y al curso rapidísimo de muchas de ellas, y por otro a la relativa lentitud de los métodos microbiológicos convencionales, lleva a partir de la década de los años setenta a la investigación de técnicas microbiológicas rápidas, suficientemente sensibles y específicas para que puedan ser de utilidad práctica en el diagnóstico de la enfermedad infecciosa. Esto fué posible porque existía una toma de conciencia sobre la conveniencia / de disponer de métodos rápidos de diagnóstico y una tecnología avanzada, que iba a permitir el desarrollo de buen / número de ellos.

Según algunos autores (137) los métodos rápidos, pueden ser: métodos urgentes o acelerados. Los métodos urgentes responden a una urgencia clínica, cuando el enfermo está en situación comprometida y se requiere un examen rápido / de la muestra para ofrecer una ayuda diagnóstica y terapéutica con prontitud. Los métodos acelerados se aplicarían - para sustituir a métodos convencionales lentos, reduciendo el tiempo en que se obtienen los resultados y por lo tanto los gastos de hospitalización, al iniciar más pronto la terapéutica y obtener la curación del enfermo en menos tiem-

po. Utilizando estos métodos hay que comprobar mediante -/ los controles de calidad oportunos que la reproductividad del método se mantiene (165).

En cualquiera de los dos casos se trata de que el médico pueda disponer en menor tiempo, de datos sobre el diagnóstico etiológico y la sensibilidad de los antibióticos , para decidir el tratamiento. Esta circunstancia que beneficia al enfermo, adquiere enorme importancia cuando se trata de infecciones como sepsis, meningitis y otras infecciones graves que comprometen la vida.

Para que estas técnicas rápidas tengan, desde el punto de vista práctico verdadera importancia, son necesarias dos condiciones; la primera de ellas, que los médicos que manejan enfermedades infecciosas tengan conocimiento exacto de las técnicas rápidas que el laboratorio de Microbiología puede poner a su disposición y de las indicaciones / precisas de dichas técnicas. Deben de estar informados de la forma en que han de recoger las muestras y de un adecuado envío al laboratorio, pues de estas circunstancias va a depender en gran parte el correcto procesamiento de las - muestras y la obtención rápida de resultados. La segunda / condición es que el médico reciba de una forma rápida los resultados. De nada sirve la realización de un método rápido de diagnóstico, si los resultados obtenidos no llegan -

de forma precisa y con rapidez al médico que ha de utilizarlo para formar un juicio diagnóstico e instaurar el tratamiento adecuado. En la era de la informática estas situaciones debían de estar resueltas; sin embargo, en muchas / ocasiones no podemos estar seguros de que el médico recibirá la información pertinente de una manera rápida si no es mediante un contacto directo con el laboratorio (120).

La rápida información de los resultados en Microbiología, debe ser objetivo de todos los laboratorios ya que puede influir directamente en las decisiones terapéuticas sobre todo en determinados enfermos o situaciones como: en docarditis, infección producida por microorganismos no -/ habituales, enfermos inmunodeprimidos o con catéteres urinarios, quemados, pacientes con fibrosis quística o recién nacidos (119).

Otro factor a considerar en las técnicas rápidas es el coste ya que aunque existen técnicas de este tipo con / unos costes muy bajos ,en otras ocasiones se necesitan apa ratos, reactivos o ambas cosas a la vez, de coste y mantenimiento muy elevados que los hacen inasequibles para algunos laboratorios y por lo tanto es importante conocer el dato costo/beneficio y el rendimiento de estas técnicas para elegir la más adecuada a cada laboratorio.

En resumen, la importancia de los métodos rápidos se debe a (120):

- 1) Posibilidad por parte del médico de solicitar métodos rápidos o inmediatos.
- 2) Una toma de conciencia del laboratorio para utilizar métodos rápidos y asegurar una recepción de / resultados en un corto espacio de tiempo.
- 3) Crear las condiciones necesarias con médicos de - servicios especiales para una mayor rapidez en la información.
- 4) Los resultados están a disposición del médico cuando debe tomar decisiones, con lo cual dispone de más datos en beneficio del enfermo.
- 5) Conocimiento por parte del laboratorio de los costes comparativos de las técnicas rápidas por lo / que puede elegir las más adecuadas.

Las técnicas de diagnóstico rápido en Bacteriología que pueden ofrecer una respuesta en un periodo corto de tiempo a partir del momento en que se recibe la muestra se pueden clasificar en (114):

- 1) Técnicas que utilizan la visualización del agente etiológico.
- 2) Técnicas que buscan antígenos solubles utilizando anticuerpos específicos.
- 3) Técnicas que identifican sustancias elaboradas - por el agente infeccioso o detectan sustancias / producidas por el huésped en respuesta a una in - fección.

Dentro de estos apartados vamos a revisar las técnicas a nuestro juicio más interesantes y las más utilizadas, tanto manuales como automatizadas.

## II. - TECNICAS QUE UTILIZAN LA VISUALIZACION DE LOS AGENTES ETIOLOGICOS

Desde hace muchos años, se conoce que la observación directa de muestras teñidas al microscopio, pueden ofrecer con frecuencia aportaciones y orientaciones importantes al diagnóstico etiológico de las enfermedades infecciosas.

Sin embargo, esta sencilla técnica, parecía haber sido relegada y poco utilizada por diversas razones, entre - las que podemos incluir: rechazo a usar la tinción de Gram

u otro tipo de tinciones por falta de experiencia; dedicar escaso tiempo al examen e interpretación de las preparaciones; falta de selección de las muestras a examinar; rechazo a utilizar técnicas sencillas, prefiriendo técnicas / diagnósticas más modernas (102).

Entre estas razones cabe destacar la primera y la tercera. La falta de experiencia en la observación de una tinción de Gram debida en muchos casos a poco uso, hacen difícil la interpretación y al no obtener la información deseada, se tiende a dejar de usar la tinción. También la falta de selección de las muestras y el uso indiscriminado de esta tinción, puede hacer que se utilice poco, ya que en / ciertas muestras, la información que se puede obtener con un Gram es escasa o nula, mientras que en otras ocasiones ofrece una ayuda inestimable.

No obstante, junto con el desarrollo de nuevas técnicas electrónicas, inmunológicas y biológicas para la rápida detección de microorganismos, se observa también un nuevo interés en volver a utilizar estas técnicas. Lo que no es extraño si tenemos en cuenta el poco coste, su sencillez y que difícilmente encontraremos otro procedimiento diagnóstico más rápido. Además solo se necesita para la observa-ción un microscopio óptico con objetivo de inmersión, que existe prácticamente en todos los laboratorios.

Estos métodos de visualización al microscopio de muestras teñidas, como cualquier otra, necesita que el producto que va a ser examinado sea representativo del lugar de la infección. Las principales ventajas que nos ofrecen estas técnicas son, que basándose en la composición celular de la muestra (polimorfonucleares, linfocitos o ausencia / de leucocitos) y la morfología y agrupación bacteriana permiten hacer una fundada orientación diagnóstica y por otra parte seleccionar las técnicas apropiadas que se deben seguir para obtener un diagnóstico etiológico correcto.

Dentro de estas técnicas la tinción de Gram la podemos considerar como un prototipo aunque también se utilizan con frecuencia otro tipo de tinciones. Las más importa<sup>n</sup>tes en bacteriología son las siguientes:

### II.1. Tinción de Gram

Descrita por Hans Christian Gram en 1884 (68). Es -/ una tinción que permite observar la morfología, agrupación de las bacterias y además es diferencial clasificando las bacterias que se tiñen con esta técnica en Gram positivas y Gram negativas.

La tinción de Gram es el método más utilizado en general y en situaciones de urgencia. La observación de una

preparación teñida por el método de Gram, realizada por personal experto, puede proporcionar una rápida información y en ocasiones una presunción diagnóstica muy aproximada o igual al diagnóstico exacto.

Algunos autores utilizan tinciones simples como alternativa como azul de metileno (123).

## II.2. Tinción de naranja de acridina

Es un fluorocromo, es decir un compuesto fluorescente que tiñe los ácidos nucleicos. Esta técnica empezó a usarse al proponer el uso de una solución de naranja de acridina a bajo pH para teñir muestras clínicas, ya que permitía una diferenciación entre las bacterias que se teñían naranja y las células que se teñían de verde o amarillo, al ser examinadas en un microscopio de fluorescencia (100).

Potencialmente puede ser superior a la tinción de Gram (105) en el examen de muestras directas, ya que se produce una tinción llamativa de las bacterias que las diferencia del fondo de la preparación, de células y de otros componentes.

En este momento está considerada (114) como más sen-

sible que el Gram en la detección de microorganismos que se encuentran a muy baja concentración, si bien al ser la tinción monocromática, se recomienda practicar un Gram posteriormente.

En los casos en que la muestra sea poco rica en bacterias y no se disponga de microscopio de fluorescencia se recomienda (62) la tinción de Pappenheim Cristallovitz como tinción rápida, sencilla y de mayor contraste que el / Gram, por lo que proporciona una mayor sensibilidad que éste.

### II.3. Tinción de Ziehl-Neelsen o auramina

La investigación de bacterias ácido-alcohol resistentes, se realiza habitualmente, desde el punto de vista de su visualización, mediante la tinción de Ziehl-Neelsen. Esta tinción aprovecha la propiedad de estas bacterias de resistir la decoloración por un alcohol ácido para ofrecer - nos una tinción diferencial.

Como alternativa se puede utilizar la tinción con / auramina, que es un colorante fluorescente. La observación se hace con microscopio de fluorescencia. Las dos tinciones han demostrado ser equivalentes en cuanto a sensibilidad (52 %) y especificidad (99.9 %) (153). Sin embargo, la

tinción con auramina permite una observación a menor aumento por lo que el tiempo de observación se acorta. Debido a esto es aconsejable esta tinción siempre que haya que examinar gran número de muestras.

#### II.4. Microscopio de campo oscuro

El examen de muestras en microscopio de campo oscuro es el método de elección (114) para la detección de Treponema pallidum en las lesiones de sífilis primaria.

#### II.5. Utilidad e indicaciones del diagnóstico microscópico en distintos tipos de muestras o infecciones.

A) Meningitis bacteriana aguda. El diagnóstico etiológico de una meningitis aguda mediante el examen de Líquido cefalorraquídeo, es probablemente una de las peticiones más urgentes y dramáticas que puede recibir un laboratorio de microbiología. En estas ocasiones una tinción de / Gram es de un extraordinario valor, pues en un tiempo inferior a una hora desde que se extrajo el líquido cefalorraquídeo podemos obtener una información en muchos casos decisiva para la administración de una antibioterapia efectiva.

Basándose en la morfología y en la probabilidad estadística la presencia de diplococos Gram negativos, diplococos Gram positivos o bacilos Gram negativos finos sugieren claramente la posible identidad del microorganismo observado (N. meningitidis, S. pneumoniae o H. influenzae) (102, 153).

El resultado negativo de una tinción de Gram en una extensión de líquido cefalorraquídeo con un número apreciable o abundante de leucocitos nos inclina a realizar otras técnicas como:

- 1) Centrifugación del líquido cefalorraquídeo y - / hacer una tinción de Gram del sedimento; el exá - men de esta muestra concentrada puede ofrecernos resultados positivos.
- 2) Tinción del sedimento con naranja de acridina a pH ácido. Esta tinción es más sensible en muestras con escasas bacterias, pudiendo observar bacterias que aparecían enmascaradas en la tinción de Gram (98, 105).
- 3) Un resultado negativo de todas las técnicas microscópicas antes citadas nos orientará hacia otras / técnicas rápidas que pueden ofrecer el diagnósti

co etiológico.

B) Bacteriemia. El número de microorganismos existentes en la sangre en una bacteriemia es muy variable, pero con frecuencia es un número pequeño. En ocasiones es menor de una bacteria por ml. de sangre (193). En estas circunstancias no es difícil reconocer que el exámen microscópico de la sangre periférica como método diagnóstico para detectar el agente etiológico prácticamente carece de utilidad.

Se ha propuesto el exámen microscópico, previa tin-ción, de la capa de leucocitos que aparece en sangre cen-trifugada, con el objetivo de detectar rápidamente bacte-rias (20, 55, 97) (buffy coat). Sin embargo, no ha prosperado como exámen de rutina en infecciones humanas, debido seguramente a la pequeña concentración en que se encuentran los microorganismos en muchos casos y a la alta concen-tración que se necesita para que sean visualizados en la / preparación hecha con la capa de leucocitos que se obtiene centrifugando sangre del enfermo (147).

C) Infección del tracto genitourinario.

Orina: La sospecha de infección urinaria provoca sin duda un gran número de peticiones de exámenes bacteriológicos. Se calcula que al menos una tercera parte de las muestras que se reciben en los laboratorios de Microbiolo

gía Clínica de los Hospitales, son orinas, de las cuales -  
menos del 25 % son positivas para bacterias patógenas. Por  
ello seguramente debe buscarse una forma sencilla, rápida  
y a ser posible poco costosa para seleccionar las orinas -  
de los enfermos con infecciones del tracto urinario.

En este sentido, la presencia de dos o más bacterias  
por campo (con objetivo de inmersión) en una tinción de -/  
Gram hecha de una orina recogida correctamente y no centri-  
fugada, significa con un alto valor predictivo la presen -  
cia de por lo menos  $10^5$  bacterias ml (179). Estos resulta -  
dos obtenidos del exámen microscópico deben ser confirma -  
dos por cultivo.

Las tinciones de ácido-alcohol resistentes (Ziehl -  
Neelsen o auramina) pueden servir de ayuda en el diagnósti -  
co de la tuberculosis renal o diseminada aunque un resulta -  
do positivo debe ser interpretado con cautela ya que pue -  
den aparecer micobacterias no tuberculosas en la uretra -  
de personas sanas.

Gonorrea: En un gran porcentaje de pacientes sobre /  
todo varones heterosexuales, el diagnóstico de gonorrea -  
puede hacerse con bastante seguridad mediante el exámen de  
una tinción de Gram del exudado uretral. El diagnóstico de  
pende del hallazgo de diplococos Gram negativos con morfo-

logía característica de Neisseria, dentro o fuera de leucocitos polimorfonucleares. Cuando la muestra procede de mujeres, o de mucosas distintas de la uretra en varones homosexuales, la observación de diplococos Gram negativos en / preparaciones, puede o no corresponder a N.gonorrhoeae sino a otras especies de Neisseria. Cuando N.gonorrhoeae se encuentra en escaso número, su presencia puede ser inadvertida. En estas ocasiones la tinción de naranja de acridina / puede ser una ayuda para la visualización de estas bacterias, aunque como en todos estos casos el diagnóstico que se puede hacer es de presunción.

Para la identificación correcta se necesitan otros procedimientos (cultivo o detección de antígenos).

La interpretación incorrecta de Acinetobacter calcoaceticus variedad anitratus como N. gonorrhoeae en uretritis es un problema que probablemente se produce en muy pocas ocasiones.

Vulvovaginitis: En una tinción de Gram de exudado vaginal, se pueden observar esporas o hifas de levaduras, en un 70-100 % (153); no obstante, como las levaduras pueden encontrarse en la vagina de un número importante de mujeres asintomáticas, hay que tener cuidado al interpretar / los resultados microscópicos debiendo relacionarlos con / los síntomas que presente la enferma.

El diagnóstico de Trichomonas se hace habitualmente observando estos flagelados en una preparación en fresco de exudado vaginal o en preparaciones teñidas con Gram o naranja de acridina y examinadas por personal experto.

D) Infecciones del tracto respiratorio superior. Una vez que la difteria ha dejado de ser un problema, también lo ha dejado de ser el difícil diagnóstico de presunción - de esta enfermedad mediante la observación de una preparación teñida, del exudado de una membrana sospechosa.

Sin embargo, persiste el interés por la posibilidad de un diagnóstico rápido de faringitis estreptocócica del grupo A, mediante el examen de una tinción de Gram de exudado faríngeo (40) aunque generalmente se prefieran otras técnicas inmunológicas más específicas para este diagnóstico (89).

E) Infecciones del tracto respiratorio inferior. Existen varias formas de obtener muestras del tracto respiratorio inferior, siendo las más utilizadas: esputo emitido espontáneamente, punción transtraqueal o punción transpulmonar.

Esputo: Una tinción de Gram del esputo observada a pocos aumentos nos puede determinar la calidad de la muestra, según los leucocitos y células epiteliales que se ob-

serven por campo, y por lo tanto si la muestra es -/ aceptable para cultivo. En caso afirmativo la preparación debe ser examinada con objetivo de inmersión para tratar - de establecer el diagnóstico etiológico de la neumonía. El diagnóstico de la neumonía presenta especiales problemas y en este aspecto, el potencial de la microscopía en el diagnóstico rápido parece ser mayor que su aprovecha-/ miento.

Los esputos pertenecientes a enfermos sospechosos de tuberculosis pulmonar o micobacteriosis, deben ser teñidos con Ziehl-Neelsen o Auramina y examinados en busca de bacilos ácido-alcohol resistentes.

Punción transtraqueal y punción transpulmonar: Todos los aspirados procedentes de punción transtraqueal y pun- ción transpulmonar deben ser teñidos con Gram de forma rutinaria y examinados para determinar si existe flora, bacteriana y si ésta es mono o polimicrobiana, como parte de - una rápida orientación diagnóstica (estas muestras, también deben ser teñidas con técnicas apropiadas para micobacterias y L. pneumophila).

F) Gastroenteritis. El examen microscópico de heces de enfermos con gastroenteritis tienen una utilidad muy limitada y sólo se utiliza ocasionalmente.

El examen microscópico de heces, se utiliza fundamentalmente mediante una preparación teñida con azul de metileno o Gram para observar la presencia o ausencia de leucocitos polimorfonucleares. Si estos se encuentran en proporción abundante, se asocia a colitis por bacterias patógenas invasivas como Salmonella, Shigella o Campylobacter. Por el contrario la ausencia de leucocitos se puede asociar a patógenos intestinales toxigénicos no invasivos como Vibrio cholerae y Escherichia coli enterotoxigénico.

G) Heridas, abscesos y exudados. La observación al microscopio de una tinción de Gram de exudados de heridas, abscesos y exudados de distinta procedencia, pueden ayudar a una orientación diagnóstica de la clase de bacteria que está produciendo la infección, como estafilococos o estreptococos cuando se observan cocos Gram positivos en racimos o en cadenas; clostridios si se ven bacilos Gram positivos de gran tamaño, o bacteroides si se aprecian bacilos Gram negativos pleomórficos. También se pueden apreciar si existe una infección mixta.

Con frecuencia existen gran cantidad de células procedentes de tejidos, células inflamatorias y restos celulares que impiden observar con la suficiente claridad las bacterias. En éstos, como en otros casos, la tinción con naranja de acridina a pH ácido es una importante ayuda pa-

ra la detección de las bacterias.

En resumen, la microscopía es una de las técnicas -/ más antiguas en el diagnóstico microbiológico. Su uso ha - sido mejorado no sólo en la calidad de los instrumentos óp - ticos, sino en las técnicas de tinción. La rapidez con que se puede llevar a cabo hace de ella un elemento imprescin - dible para obtener datos razonablemente precisos con los / que efectuar una orientación diagnóstica y un tratamiento adecuado.

### III.- DETECCION DE ANTIGENOS UTILIZANDO ANTICUERPOS ESPECIFICOS

Dejando aparte la inmunofluorescencia directa, que - es una técnica que pudiéramos considerarla antigua, en los últimos años se han desarrollado un buen número de técni - cas inmunológicas para detectar antígenos solubles y que / compiten por demostrar cual es más sensible. Entre ellas , por el interés que tienen, deben ser citadas, coaglutina - ción, aglutinación de látex, contrainmunolectroforesis y ELISA (102, 114).

#### III.1. Inmunofluorescencia directa en identificación de bacterias

El primero que utilizó la inmunofluorescencia como -

técnica de diagnóstico, fué Coons y cols, que demostraron la existencia de antígenos neumocócicos de tipo 3 en ratones infectados experimentalmente, haciendo reaccionar cortes de tejido congelado, con un anticuerpo de conejo que había sido conjugado con fluoresceína-4-isocianato.

Con el progreso técnico de los microscopios de fluorescencia y la introducción del isotiocianato, que facilita la conjugación de la fluoresceína con las inmunoglobulinas, se produjo una expansión de esta técnica, aplicándose al estudio de numerosas bacterias y creándose grandes / expectativas.

Sin embargo, los problemas e inconvenientes que surgieron en la interpretación de los resultados, hicieron -/ disminuir el interés por estas técnicas.

La inmunofluorescencia directa es un método inmunológico que emplea un colorante fluorescente conjugado directamente con un anticuerpo específico, que al ser puesto en contacto con el antígeno adecuado, se une a él produciendo se una reacción inmunológica. Como resultado de ella, queda teñida la bacteria con el colorante fluorescente y al / ser observada en un microscopio de fluorescencia, puede -/ verse su morfología, lo que supone una ayuda para la interpretación de los resultados.

Si el anticuerpo se une al antígeno, y se utiliza -/ una segunda globulina marcada con el colorante fluorescente que se une al complejo antígeno-anticuerpo antes formado, se trata de una reacción de inmunofluorescencia indirecta.

Los inconvenientes de estas técnicas, que no son fáciles de soslayar, se centran fundamentalmente en: bajo -/ grado de sensibilidad, pues los antígenos deben encontrarse en la muestra en alta concentración; posibilidad de / reacciones cruzadas o de la absorción de una parte del conjugado por antígenos tisulares, lo que afecta a la especificidad del método; la subjetividad en la interpretación - de resultados y la necesidad de disponer de microscopistas bien entrenados. En bastantes ocasiones la ayuda que supone el observar la morfología de la bacteria, es insuficiente para prevenir diagnósticos equivocados.

Debido a que la inmunofluorescencia es una técnica / de difícil realización, es extraordinariamente importante disponer de antisueros que hayan sido evaluados cuidadosamente, así como de un microscopio de fluorescencia de alta calidad preferentemente con iluminación de luz incidente - (epifluorescencia) que presenta grandes ventajas sobre los tradicionales sistemas que emplean luz transmitida a través de un condensador de campo oscuro. Como colorante fluoo

rescente es preferible utilizar el isotiocianato de fluo - resceína.

Bacterias en las que se emplea generalmente técnicas de inmunofluorescencia

- Bacteroides

Se han evaluado técnicas de fluorescencia directa e indirecta para Bacteroides fragilis y Bacteroides melanogenicus (44, 82, 90). Las técnicas directas, utilizando -/ conjugados comerciales y las indirectas antisueros preparados por los mismos investigadores.

La sensibilidad de las técnicas de inmunofluorescencia indirecta ha sido muy alta para Bacteroides fragilis, pero presentan la dificultad de tener que preparar los anti - sueros.

Los conjugados comerciales, muestran una sensibilidad entre moderada y alta para Bacteroides fragilis y melanogenicus, y una especificidad alta. Estas técnicas de inmunofluorescencia, se utilizan bien directamente en muestras clínicas o bien a partir de una colonia obtenida mediante cultivo anaerobio. Cuando se utilizan directamente muestras clínicas, es muy conveniente que estas muestras sean envia

das en recipientes para transporte de muestras anaerobias, donde se introduce la muestra (pus o exudado purulento) . La recogida de la muestra con torunda de algodón no es adecuada para el estudio de Bacteroides por inmunofluorescencia ni en general para el estudio bacteriológico de anaerobios.

Se han advertido reacciones cruzadas de Bacteroides melaninogenicus con otras bacterias aerobias y anaerobias, que pueden influir en los resultados ya que aunque la morfología de las bacterias con las que se produce la reacción cruzada es en ocasiones diferente a la de Bacteroides melaninogenicus, no siempre es fácil de advertir esa diferente morfología en muestras clínicas.

En resumen, y a pesar de algunos inconvenientes (como el últimamente expresado), existen conjugados comerciales para el diagnóstico rápido y directo de Bacteroides fragilis y Bacteroides melaninogenicus que son utilizados por bastantes laboratorios en el intento de ofrecer rápidamente resultados sobre infecciones producidas por estas bacterias (resultados que pueden comportar un cambio de actitud terapéutica), si bien el resultado definitivo nos lo proporcionará el cultivo en medios anaerobios.

- Legionella pneumophila.

Las neumonías producidas por Legionella pneumophila han sido hasta hace poco de difícil diagnóstico, primero - por el desconocimiento del agente etiológico (el descubrimiento de la bacteria es de hace pocos años) y después por que debido a sus requerimientos nutritivos se encuentran - serias dificultades para poder cultivarlo.

Por ello no es difícil comprender que se utilicen -/ técnicas de inmunofluorescencia directa para el diagnóstico de L. pneumophila antes que las técnicas de cultivo . Hasta hace poco tiempo los únicos conjugados para inmunofluorescencia directa disponibles eran producidos por el / CDC (Center for Disease Control), si bien hoy existen conjugados comercializados. La sensibilidad de la prueba es - moderada pero la especificidad con controles adecuados es alta.

Es muy importante en esta técnica evitar la contaminación de las muestras. Así mismo hay que tener presente - la posibilidad de una contaminación aérea (colonización -/ del aire por Legionella) así como la obtención de falsos - positivos por reacciones cruzadas con bacterias aerobias o anaerobias lo que hace necesaria una confirmación posterior por cultivo o por seroconversión.

No obstante, la inmunofluorescencia directa a *Legionella* es una técnica ampliamente utilizada por numerosos laboratorios para el diagnóstico rápido de las infecciones respiratorias producidas por esta bacteria, que por otro lado se revelan cada vez más frecuentemente.

- Chlamydia trachomatis.

Desde que se conoce que Chlamydia trachomatis además de producir enfermedades como tracoma o conjuntivitis de inclusión es capaz de producir enfermedades de transmisión sexual (uretritis, cervicitis), el interés por conseguir un diagnóstico etiológico rápido de las enfermedades producidas por esta bacteria, ha aumentado de forma importante. Así se han desarrollado técnicas comerciales de inmunofluorescencia directa para la detección de Chlamydia trachomatis, que han sido aplicadas sobre todo al diagnóstico de enfermedades de transmisión sexual. Estas técnicas compiten hoy día con otras técnicas inmunológicas como ELISA y con las técnicas de cultivos celulares.

- Bacterias productoras de meningitis

Las técnicas de inmunofluorescencia directa fueron rápidamente aplicadas al diagnóstico de la meningitis bacteriana aguda. Los resultados obtenidos con Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae y Haemophilus influen-

zae, fueron buenos especialmente con Haemophilus influenzae. Sin embargo a pesar de las ventajas que pueden aportar la especificidad inmunológica de estos métodos, es interesante conocer que con una técnica más sencilla, más rápida y más barata como es la tinción de Gram, se obtienen resultados casi iguales a los de la inmunofluorescencia directa (131).

- Otras bacterias en que se han empleado técnicas de inmunofluorescencia.

Durante bastantes años se han empleado técnicas de IFD en Estados Unidos de forma esporádica, para el diagnóstico de Bordetella pertussis, pero la poca correlación de los resultados obtenidos hace pensar que no se puede confiar sólo en esta técnica para el diagnóstico de esta infección.

También se ha aplicado la inmunofluorescencia al diagnóstico directo de la sífilis en lesiones sospechosas, aunque parece que la sensibilidad y especificidad de estas pruebas son parecidas a las obtenidas con la microscopía de campo oscuro, si bien la inmunofluorescencia directa tiene la ventaja de su especificidad inmunológica.

Las técnicas de inmunofluorescencia en muestras di-

rectas para el diagnóstico de N. gonorrhoeae y Streptococo betahemolítico del grupo A, han sido poco utilizadas.

Igualmente, las reacciones cruzadas con otras entero bacterias, han limitado el uso de estas técnicas para la / identificación de salmonellas y shigellas.

### III.2. Contrainmunoelectroforesis

La contrainmunoelectroforesis (CIE) fué descrita en 1959 y su primera aplicación clínica fué la detección de - Antígeno Australia (HBs-Ag). En seguida otras técnicas - la reemplazaron en esta investigación y la contrainmunoelec troforesis se convirtió en una técnica para la detección - rápida de antígenos bacterianos en líquidos corporales y para la identificación inmunológica de ciertas bacterias.

La contrainmunoelectroforesis se basa en el princi - pio de inmunodifusión modificado, de forma que el antígeno y el anticuerpo se dirigen uno hacia el otro por electrofo resis. El antígeno se coloca en un pocillo en el cátodo y debido a su carga negativa es atraído hacia el ánodo. El - anticuerpo es colocado en un pocillo en el ánodo y se mueve hacia el cátodo debido a una corriente endosmótica y a su carga negativa.

Si las condiciones de voltaje, pH, buffer, concentraciones de antígeno y anticuerpo y la capacidad de reacción del antisuero es adecuada, se formará una línea de precipitación equidistante de los pocillos situados en el ánodo y en el cátodo, aproximadamente entre 30 y 45 minutos.

Como en otras técnicas de laboratorio, hay que controlar todos los componentes que intervienen en la reacción: la calidad del antígeno, el buffer (pH 8.2-8.6); el soporte para la reacción inmunológica (generalmente agarosa) y la cámara de electroforesis, que contiene el buffer, transmite la corriente eléctrica y proporciona un soporte al gel de agarosa.

Las aplicaciones de CIE en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas las podemos resumir en: a) Detección de antígenos en líquidos corporales; b) Determinación de título de anticuerpos (baja sensibilidad); c) Evaluación del pronóstico: la presencia o aumento de antígenos, se correlaciona con mala evolución y aumento de la mortalidad; d) Identificación de aislamientos clínicos (6).

Entre estas aplicaciones la más utilizada ha sido la detección de antígenos en líquidos corporales mediante una amplia variedad de antígenos específicos comercializados / entre los que son más comunes: a) N. meningitidis: El uso

de antisueros polivalentes para los serogrupos A, B, C, Y, W135, no ha sido satisfactorio por lo que es necesario la utilización de sueros monovalentes. El antisuero de N. meningitidis grupo B posee una sensibilidad tan baja que / hace poco útil la realización de esta prueba; b) S. pneumoniae: Se conocen 84 serotipos distintos de neumococo. Se / utiliza para la técnica un antisuero polivalente (onniserum) que se ha mostrado satisfactorio; c) H. influenzae: De los serotipos de H. influenzae conocidos sólo es necesario realizar la prueba frente al tipo b.

De la relación de antígenos disponibles podemos deducir que la CIE se utiliza especialmente en el diagnóstico bacteriológico de meningitis y neumonías.

El diagnóstico de meningitis producido por los tres patógenos más importantes (N. meningitidis, S. pneumoniae y H. influenzae) para muchos autores se obtiene con CIE en un elevado número de casos (53) y es más sensible que el / Gram (6, 38, 46, 72, 134), mientras que para otros (32), la tinción de Gram y el cultivo se muestran superiores en CIE. Esta prueba rápida y específica tiene sin embargo un importante inconveniente en nuestro país y es que siendo la meningitis producida por N. meningitidis del grupo B una de las más frecuentes, su antisuero específico no alcanza la sensibilidad adecuada.

El diagnóstico de neumonía neumocócica es frecuentemente difícil ya que S. pneumoniae se encuentra como flora habitual en la faringe (146) de individuos sanos, por lo que su aislamiento en esputos (al contaminarse estos con flora faríngea al ser espontáneamente emitidos) no es una prueba absoluta de infección por S. pneumoniae. Sin embargo, la virulencia del organismo depende de la presencia de un polisacárido capsular (96). Este polisacárido capsular puede ser detectado (37) y una de las técnicas rápidas usadas para ello es la CIE.

La detección del polisacárido capsular en esputo, aparentemente es capaz de distinguir entre colonización e infección (186) y en enfermos con cultivos negativos tratados con antibióticos (170), puede resultar positiva la detección de antígeno ya que este persiste en el esputo entre dos y cinco días.

Sin embargo, parece que con técnicas más sencillas y sensibles como la coagulación, se obtienen resultados similares a los obtenidos con CIE (186).

### III.3. Técnicas de aglutinación

Las técnicas de aglutinación desde hace muchos años, han sido ampliamente utilizadas en los bancos de sangre y

en laboratorios clínicos para determinar por ejemplo el -/ factor reumatoide o anticuerpos bacterianos. Ello hace que estas técnicas nos resulten familiares y como consecuencia de ello hayan tenido una gran aceptación al haber sido aplicadas al diagnóstico directo de las enfermedades infecciosas. En muchos casos pueden ser utilizadas como técnicas - de elección para la detección de antígenos si los reactivos son de calidad (35).

La aglutinación es una manifestación secundaria de - la reacción antígeno-anticuerpo y se produce en teoría siempre que anticuerpos y antígenos se unan con enlaces amplios. Los anticuerpos difieren unos de otros de forma importante en su capacidad de aglutinar con los antígenos. Las inmunoglobulinas M pueden ser 750 veces más eficientes que las - IgG en las reacciones de aglutinación (35).

Pueden utilizarse como anticuerpos, inmunoglobulinas - completas purificadas o anticuerpos monoclonales. La utilización de estos últimos confiere una alta especificidad a la reacción.

Las reacciones de aglutinación directa son de muy fácil realización. Se coloca una gota de la muestra clínica en un portaobjetos y se añade una gota del anticuerpo con partículas sensibilizadas. Ambas gotas se mezclan con un -

aplicador y/o mediante rotación. En un tiempo inferior a 10 minutos, se obtienen los resultados de la aglutinación. La interpretación del grado de aglutinación es bastante -/ subjetiva y requiere práctica por parte del operador. La - lectura de los resultados de la aglutinación deben compa - rarse simultáneamente con los obtenidos con los controles de reactivo. También es conveniente la utilización de con - troles positivos y negativos.

Es importante conocer que las reacciones de aglutina - ción pueden dar falsos resultados debido a fenómenos de zo - na. Si existe un exceso de antígenos en la reacción, la aglutinación no se produce. Por lo tanto, en las muestras negativas se debe repetir la reacción una vez diluídas pa - ra evitar el exceso de antígeno como posible causa de una reacción negativa falsa.

### III.3.1. Aglutinación de látex

El látex son partículas de 0.8 micrometros aproxima - damente, poco costosas y buenas transportadoras de anticuer - pos. Una vez lavadas, si se almacenan a 4º C permanecen es - tables indefinidamente.

Las reacciones de látex utilizan obviamente partícu - las de látex de poliestireno y a esta mezcla se le añade -

albúmina bovina. Con el reactivo preparado de esta forma , es posible mostrar la presencia de cantidades muy pequeñas de antígeno específico en muestras patológicas.

La aglutinación de látex detecta ordinariamente como poco 1 ng/ml. de polisacárido bacteriano purificado y en ocasiones ha llegado a detectar 0.2 ng/ml. (191). Los resultados que se obtienen con la aglutinación de látex son superiores a los conseguidos con CIE (35, 54, 88, 191).

### III.3.2. Coaglutinación

La coaglutinación es un método descrito en 1973(101) según el cual, una cepa de Staphylococcus aureus (cepa Cowan I) que contiene proteína A, sustancia situada a nivel de la pared celular, se hace crecer en caldo, se lava, se fija con 0.5% de formaldehído y se trata con calor a 80° C . Las partículas así tratadas son estables durante muchas semanas. Los anticuerpos específicos responsables de la reacción se unen por su fragmento Fc con la proteína A del estafilococo, quedando libre el fragmento Fab para reaccionar específicamente con el antígeno.

Las partículas estafilocócicas pueden causar problemas al aglutinar con inmunoglobulinas o con anticuerpos específicos antiestafilocócicos en muestras clínicas. Este -

inconveniente que parece ser frecuente, puede ser eliminado en la mayoría de los casos, calentando las muestras a / 65-80° C durante 5 a 10 minutos. La aglutinación con esta técnica se produce en 30 a 60 segundos y es visible macroscópicamente. En la coaglutinación se detectan concentraciones de antígenos bacterianos del orden de 8 a 12 ng/ml. -/ (131).

Existen comercializados equipos para reacciones de / aglutinación de látex y coaglutinación, directamente de -/ las muestras clínicas, con los siguientes microorganismos: Streptococcus pneumoniae, Haemophilis influenzae tipo b, Neisseria meningitidis (grupos A, B, C, Y, W135), Streptococcus grupo A y B de Lancefield.

Se han utilizado estas técnicas para la detección rápida de antígenos de las bacterias antes mencionadas fundamentalmente en líquido cefalorraquídeo, suero, orina, exudados faríngeos y esputo (24, 36, 43, 47, 54, 73, 88, 89 , 131, 172, 182, 191, 195, 201, 202).

En la detección de antígenos de S. pneumoniae en esputos de enfermos de neumonía, la coaglutinación se ha mostrado superior a CIE ya que es una técnica más sencilla y tiene la misma sensibilidad en muestras de enfermos con - menos de 12 horas de tratamiento antibiótico; en muestras

de enfermos con más de 12 horas de antibioterapia se obtienen mayor número de resultados positivos con coaglutinación que con CIE (52). En cambio la aglutinación de látex ha demostrado una buena sensibilidad, superior a la coaglutinación en la detección rápida de Streptococcus grupo A, en exudados faríngeos (89).

Aunque se han utilizado estas técnicas en suero y orina, sin duda la aplicación más generalmente extendida es en el diagnóstico de la meningitis bacteriana aguda.

La mayoría de los trabajos que se han ocupado de la evaluación de estas técnicas, comparándolas entre sí y también con la contrainmunolectroforesis, coinciden en que tanto la aglutinación de látex como la coaglutinación son más sensibles que CIE en la detección de antígenos de N. meningitidis, S. pneumoniae, H. influenzae y Streptococcus grupo B. Como además son técnicas muy sencillas, enormemente rápidas, y su positividad está en relación directa con la concentración de antígenos y no con el número de bacterias viables (lo que ofrece la ventaja de poder obtener resultados positivos en enfermos con tratamiento antibiótico), su uso supone indudablemente un importante avance en el diagnóstico de las meningitis purulentas.

También se utilizan estas técnicas de forma habitual

para la identificación rápida de bacterias aisladas en -/ cultivo puro como Staphylococcus aureus, Streptococcus grupo A, B, C, D, E, F, G, y por supuesto S. pneumoniae, N. meningitidis y H. influenzae tipo b.

#### III.4. Inmunoensayo enzimático (ELISA)

Los métodos inmunológicos alcanzan un gran nivel con la aparición de las técnicas de inmunoensayo enzimático para la determinación de sustancias que se encuentran a bajas concentraciones, con un alto grado de precisión y seguridad.

En microbiología estas técnicas estaban limitadas a la investigación de anticuerpos y antígenos virales, pero su continua expansión ha llegado a la bacteriología pudiéndose hoy utilizar para la detección de antígenos de bacterias como Neisseria gonorrhoeae y Chlamydia trachomatis, a partir de muestras clínicas (exudados vaginales, uretrales).

Para el diagnóstico bacteriológico se utiliza generalmente un inmunoensayo enzimático de fase sólida: Las esferas tratadas con el anticuerpo específico, se incuban con la muestra, después se añade un anticuerpo específico igual al que contiene la esfera y a continuación un anticuerpo -

antiinmunoglobulina unido a un enzima (peroxidasa de rábano picante). Si las muestras contienen antígeno específico, habrá una reacción inmunológica como resultado de la cual se encontrará el enzima en la superficie de la esfera. La presencia del enzima en la esfera, se determina incubando la esfera lavada con 0-fenilendiamina (OPD) que contiene peróxido de hidrógeno, y se desarrolla una coloración cuya intensidad es proporcional a la cantidad de antígenos adsorbidos en la esfera.

Estudios realizados en N. gonorrhoeae con ELISA, demuestran una buena sensibilidad en el hombre y moderada en las mujeres (45).

Es interesante conocer que ciertas clases de N. meningitidis y N. lactamica pueden reaccionar con técnicas ELISA diseñadas para detectar antígenos de N. gonorrhoeae. Estas Neisserias no gonocócicas pueden diferenciarse de N. gonorrhoeae mediante procedimientos de cultivo e identificación. Sin embargo, otras Neisserias no gonocócicas muy raramente se pueden aislar de muestras urogenitales.

La aparición de técnicas ELISA para detección rápida de Chlamydia trachomatis ha supuesto junto con la inmunofluorescencia directa un gran avance para el diagnóstico / etiológico de las uretritis no gonocócicas (138).

IV. TECNICAS QUE IDENTIFICAN SUSTANCIAS ELABORADAS  
POR EL AGENTE INFECCIOSO O DETECTAN SUSTANCIAS PRODUCIDAS  
POR EL HUESPED EN RESPUESTA A UNA INFECCION

IV. 1. Prueba del Límulo

Se basa en el principio de que el lisado (extracto) de un crustáceo, el Límulo polyphemus se gelatiniza en presencia de cantidades extraordinariamente pequeñas de endotoxina bacteriana.

Esta prueba es especialmente recomendada para el control de los productos básicos que se van a utilizar en la fabricación de soluciones para uso parenteral (114).

También se han intentado otras aplicaciones, como la detección de bacteriuria significativa, comparando su efectividad con el Gram demostrando menores errores de interpretación (87). Su gran sensibilidad frente a las endotoxinas bacterianas, que permiten detectar cantidades por encima de 0.1 ng, han orientado su uso para el diagnóstico rápido de meningitis producidas por bacilos Gram negativos / (114). Sin embargo, esta utilidad se ve muy reducida ya -/ que la mayoría de las meningitis bacterianas están producidas por bacterias distintas de bacilos Gram negativos.

#### IV. 2. Cromatografía de gases.

Los lípidos de las bacterias se encuentran en la pared celular-membrana celular donde los ácidos grasos están unidos químicamente a otros componentes celulares. Estos ácidos grasos son liberados o escindidos y posteriormente analizados por cromatografía gas-líquido.

Así, con estas técnicas se pueden detectar la presencia de ácidos grasos volátiles y no volátiles específicos de determinados microorganismos anaerobios, directamente de muestras clínicas ya que en una flora mixta de bacterias anaerobias estrictas y anaerobias facultativas los perfiles obtenidos con la cromatografía hace posible descubrir la presencia de una especie anaerobia en particular. Esta es una de las más extendidas aplicaciones de la cromatografía de gases en microbiología ya que los métodos convencionales para el estudio de anaerobios son habitualmente lentos y es de gran interés conocer la participación de flora anaerobia en una infección, ya que en este caso con frecuencia habrá que modificar la terapia antimicrobiana.

También se puede utilizar la cromatografía de gases para la identificación de microorganismos aislados en cultivo puro pues con esta técnica y según la composición de los ácidos grasos de la pared celular se obtienen perfiles que

permiten una clasificación más precisa de las especies bacterianas. Estas técnicas han alcanzado un avanzado grado de experimentación y están abriendo interesantes expectativas en la definición de la taxonomía, hasta ahora contravertida, de muchas familias de microorganismos (114).

No obstante, la cromatografía de gases es una técnica compleja, que requiere para ser realizada correctamente una gran experiencia.

#### IV. 3. IgM específica

La investigación de IgM específica tiene un destacado valor en el diagnóstico rápido de Toxoplasmosis, Rubéola y otras enfermedades producidas por virus que se encuentran en fase activa.

#### V. DETECCION RAPIDA DE BACTERIURIA SIGNIFICATIVA

El problema del diagnóstico rápido de la bacteriuria significativa merece un tratamiento aparte, al existir gran número de técnicas disponibles, que permiten acortar considerablemente el tiempo en que se obtienen los resultados, de forma que éstos están disponibles el mismo día en que se recibe la muestra en el laboratorio .

Entre las técnicas que son más utilizadas vamos a ocuparnos de las siguientes:

#### V.1. Bioluminiscencia

La bioluminiscencia ha sido empleada junto con un fotómetro para la detección de bacteriuria significativa. El principio del método, consiste en que el adenosin trifosfato (ATP) que ha sido extraído de la bacteria mediante el sistema enzimático luciferin-luciferasa, origina la emisión de luz cuya intensidad es proporcional a la cantidad de ATP y por lo tanto a la concentración bacteriana.

Esta técnica que es de indudable rapidez (aproximadamente 30 minutos), en la obtención de resultados, puede presentar algunos inconvenientes como su alta sensibilidad, la dificultad en obtener un eficiente método de extracción de ATP que sólo actúe sobre las bacterias; o la presencia en la orina de inhibidores del sistema enzimático (34).

La sensibilidad que se obtiene con esta técnica es variable oscilando según los autores entre 73 y 93.6 %, lo mismo que la especificidad que varía entre 84.5 y 93 % (5, 10, 86).

## V. 2. Impedimetría

La presencia de microorganismos que se multiplican activamente en un medio líquido, producen cambios en la composición química del medio, con variaciones en su conductividad. Las variaciones que se producen en un determinado periodo de tiempo, son proporcionales a la concentración de microorganismos de las muestras. Algunos aparatos como Bactometer y Malthus se basan en estos principios. Estos aparatos son fáciles de manejar y no necesitan pretratamiento de la muestra. Los resultados se obtienen entre 2 y 4 horas.

Se han utilizado con resultados satisfactorios por algunos autores (21, 26). Su principal inconveniente es su fracaso para detectar bacteriurias producidas por algunos microorganismos de crecimiento lento (87, 114).

## V. 3. Métodos electroquímicos y nefelométricos

También se han propuesto (dados los buenos resultados obtenidos por sus autores) la utilización de métodos para la detección de bacteriurias basados en la medida del cambio de potencial entre dos electrodos (métodos electroquímicos) o en el uso de un nefelómetro de láser, en el que el rayo láser al atravesar una cubeta que contiene la

muestra es dispersado por las partículas de la cubeta, y la luz dispersada en un determinado ángulo es captada por un fotodetector (método nefelométrico) (17, 104, 151).

#### V.4. Esterasa leucocitaria y nitritos

En los últimos años se ha observado un especial interés, por el estudio de la detección indirecta de bacteriuria significativa, utilizando técnicas para poner de manifiesto la existencia de esterasa leucocitaria y/o nitritos (27, 42, 80, 103, 107, 116, 117, 132). Actualmente existen comercializadas tiras reactivas que facilitan la realización de las pruebas y son de gran rapidez. La prueba de la esterasa leucocitaria consiste en que la zona de la tira / reactiva correspondiente, contiene éster de indoxilo que es desdoblado por las esterases de los neutrófilos, liberando indoxilo que reacciona rápidamente con una sal de diazonio, formándose un color violeta. La reacción se produce en 60-120 segundos y el utilizar la esterasa de los granulocitos permite detectar, además de los leucocitos intactos leucocitos lisados que en su examen microscópico no se observarían.

La mayoría de las bacterias que producen infecciones urinarias reducen los nitratos existentes en la orina a nitritos. El método utilizado en las tiras reactivas se basa

en el principio de la prueba de Griess: La sulfanilamida , reacciona en presencia de un tampón ácido, con nitritos -/ formando un compuesto de diazonio que a su vez se copula - con 3-hidroxi-1, 2, 3, 4 tetrahidrobenceno-quinolina, para formar un colorante rosa-rojizo.

La mayoría de los autores coinciden, en que estas -/ reacciones solas o en combinación con otras sencillas pruebas, son útiles para la selección de orinas de enfermos con probable infección urinaria.

#### V.5. Fotometría

Las orinas diluídas en un medio de cultivo líquido e incubado a 37° C, permite conocer la existencia de bacterias, al aparecer turbidez en el medio de cultivo líquido. El tiempo necesario, depende generalmente de la concentración inicial de microorganismos. La lectura de la turbidez es realizada por nefelómetros automáticos que analizan un determinado número de muestras simultáneamente. Estos aparatos automáticos son capaces también de hacer identificaciones bacterianas y pruebas de sensibilidad (AMS, AUTOBAC, MS2) (75, 83, 93, 108).

## VI. AUTOMATIZACION Y SEMIAUTOMATIZACION

Desde hace unos años, y con retraso evidente sobre / otros campos de la Medicina, se han desarrollado las condiciones necesarias, para la fabricación de aparatos automáticos y semiautomáticos para ser utilizados en Microbiología Clínica.

La aparición de estos aparatos tiene su origen, en el intento de colocar a la Microbiología Clínica en una posición desde la que, en primer lugar, puede utilizar métodos estandarizados y tener a su disposición técnicas sensibles y específicas, con el objeto de obtener resultados precisos y seguros; y en segundo lugar, acortar el tiempo necesario para la realización de las pruebas (158).

Al principio estos aparatos se utilizaban solamente para pruebas de sensibilidad a los antibióticos, aplicándose posteriormente además para la identificación de bacterias. Así, una vez que han transcurrido 18 horas de incubación (tiempo mínimo necesario para obtener el crecimiento bacteriano), y cuando los microorganismos están aislados en cultivo puro, podemos con estas técnicas automáticas acortar de forma importante el tiempo necesario para obtener la identificación de las bacterias y las pruebas de sensibilidad antimicrobiana. Es lo que llamamos método acelerado, /

por realizarse en menos tiempo que los métodos convencionales (4, 13, 39, 78, 94, 95).

Sin embargo el desarrollo tecnológico y el trabajo de investigación en métodos rápidos, han hecho posible que estos aparatos automáticos permitan otras determinaciones como detección de bacteriuria, identificación directa de bacterias en orina, o identificación directa de microorganismos en bacteriemia a partir de los frascos de hemocultivo (85, 128, 143, 160, 168, 173, 190).

La elección de la automatización adecuada para un laboratorio de Microbiología Clínica es un problema que no es fácil de resolver debido por un lado a la rápida evolución tecnológica y por otro lado, a las distintas características y carga de trabajo de los distintos laboratorios.

Existen publicados (158) datos referentes a tipos de automatización, exactitud, tiempo de preparación de las muestras, tiempo de realización, capacidad de trabajo y datos económicos y de mantenimiento de los principales aparatos automáticos y semiautomáticos disponibles para los laboratorios de Microbiología.

En ellos observamos que la exactitud para la identificación de Enterobacterias y bacilos fermentadores es pa-

ra AMS entre 83 y 99 % y para MS-2 entre 81 y 98 %, según los distintos autores consultados. La exactitud para las pruebas de sensibilidad es para AMS entre 87 y 95 % para Autobac entre 84 y 95 % y para MS-2 80 y 95.2 % según diferentes trabajos.

El tiempo de realización de las pruebas es de 8-13 horas para AMS; 3-6 horas para Autobac y 3-6 horas para / MS-2.

Estos datos no deben ser considerados como datos inamovibles ya que las condiciones en que se han realizado -/ los trabajos y los microorganismos que se han utilizado para ellos, pueden hacer variar los resultados y de hecho en los datos antes referidos se observan en ocasiones grandes diferencias. Por otra parte los avances de la tecnología, / hacen suponer que los aparatos sean perfeccionados y que - los resultados obtenidos con ellos sean cada vez mejores.

Esta instrumentación cuyo uso se ha extendido ampliamente, sin duda representa un avance importante en la calidad del diagnóstico microbiológico.

II. UTILIDAD CLINICA Y PLANTEAMIENTO  
DEL TRABAJO

## II. UTILIDAD CLINICA Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

La utilidad clínica de un diagnóstico microbiológico rápido es indudable sobre todo en enfermedades graves que pueden ser producidas por diferentes microorganismos. Un rápido conocimiento del agente etiológico y una terapéutica antibiótica adecuada, pueden variar sin duda el pronóstico de la enfermedad.

En otras ocasiones, un diagnóstico rápido va a influir en acortar el tiempo de hospitalización y por lo tanto en un beneficio económico para el enfermo y para la sociedad. Por otra parte, también hay que tener en cuenta que en ocasiones el precio elevado de algunas técnicas rápidas no se corresponden con el beneficio obtenido por el enfermo.

En este momento existen técnicas rápidas para el diagnóstico de un buen número de microorganismos. Este trabajo se ha centrado en las técnicas rápidas de infecciones urinarias, bacteriemia y meningitis bacterianas agudas.

En infecciones urinarias, aparte de la posible gravedad del cuadro en algunas ocasiones, por el gran número de exámenes microbiológicos que generan. En las infecciones bacterianas meníngeas y septicemias, por la gravedad de estos cuadros que con frecuencia ponen en peligro la vida de

los enfermos.

- Técnicas rápidas en infección urinaria

La infección del tracto urinario se puede definir como la presencia de microorganismos en cualquiera de los tejidos del aparato urinario.

Puede localizarse en cualquier nivel de las vías urinarias (56, 127), dando lugar a cuadros bien definidos como pielonefritis, cistitis y uretritis que pueden ser sintomáticos o asintomáticos.

El tracto urinario es especialmente susceptible de padecer infecciones bacterianas en la infancia, en el embarazo, en diabéticos, en pacientes con cálculos y en enfermos sometidos a trasplante renal (12, 22, 41, 67, 122).

La importancia de la infección urinaria se debe fundamentalmente a que es la segunda causa de muerte por insuficiencia renal (después de la glomerulonefritis crónica), a que es una de las principales causas de septicemia por bacilos Gram negativos y a que producen una elevada morbilidad pudiendo considerarse como una de las infecciones más comunes en el hombre y que generan un gran número de consultas médicas y análisis microbiológicos.

En lo referente a su etiología, la gran mayoría de / las infecciones urinarias son causadas por enterobacterias siendo E. coli el organismo más frecuentemente involucrado. Entre los cocos Gram positivos, Streptococcus faecalis y / Staphylococcus saprophyticus (estos entre mujeres jóvenes) son los que se encuentran con más frecuencia. Las infecciones producidas por bacterias anaerobias son realmente escasas (69). También se ha descrito, el aislamiento de corinebacterias en enfermos con tenesmo y disuria lo que sugiere que estos microorganismos pueden tener un papel en el síndrome uretral (118).

El diagnóstico de laboratorio de las infecciones urinarias se asocia habitualmente con recuentos de 10000-100000 o más microorganismos por ml. (91), si bien algunos autores aceptan recuentos menores sobre todo en enfermos con sintomatología clínica (16). La correcta recogida de la muestra es esencial recomendándose en la mayoría de los casos, la recogida de la parte media de la primera micción de la mañana, previo lavado de genitales, en recipiente estéril. En ocasiones puede ser necesario la punción suprapúbica para confirmar la infección (49, 50). Las muestras deben ser examinadas en las dos horas siguientes a la recolección o de lo contrario, mantenerse, en nevera a 4º C . Las técnicas tradicionales incluyen cultivos para recuento de colonias e identificación de microorganismos (15).

También se utilizan portaobjetos recubiertos con medios de cultivo para sumergir en la orina, como método para el recuento estimativo de bacterias viables. Pueden ser utilizados por el mismo enfermo y como sistema de transporte (11, 15, 49, 110).

Desde hace tiempo, se han desarrollado diversas técnicas rápidas para determinar la presencia de bacteriuria significativa. Ello es debido a la gran cantidad de cultivos de orina que han de realizar los laboratorios de Microbiología Clínica, que en la mayoría de los casos supera el 30 % de las muestras recibidas y a que solamente un pequeño número de ellos (aproximadamente entre el 20 y 30 %) -/ muestran recuentos significativos. Por lo tanto, los exámenes bacteriológicos representan una gran carga de trabajo para el laboratorio, poco recompensada por resultados positivos, lo que justifica el interés en el desarrollo de las técnicas rápidas, que nos descarten de una forma fiable / las muestras negativas y nos den una información previa de las positivas, que sirva para orientar el diagnóstico y el tratamiento.

Se ha prestado una gran atención a los métodos químicos para la rápida detección de bacteriuria, como la reducción de triphenyltetrazolium chloride por el metabolismo bacteriano; la prueba de reducción de nitratos a nitritos

de Griess; la prueba de la glucosa-oxidasa basada en el metabolismo por las bacterias de pequeñas cantidades de glucosa presentes en la orina normal; y la prueba de la catalasa en la que la rápida producción de gas en la orina, al reaccionar con el peróxido de hidrógeno indica bacteriuria.

Estas pruebas han sido consideradas generalmente poco satisfactorias debido al importante número de falsos negativos y también a la falta de especificidad (115).

Sin embargo, recientemente, se ha llamado la atención sobre el recuento de leucocitos en orina sin centrifugar / como síntoma de un proceso inflamatorio en el tracto urinario. Este método ha sido aventajado en tiempo y con parecida sensibilidad, por tiras reactivas que miden la esterasa leucocitaria. Ultimamente ha sido objeto de interés especial la conjunción de esta prueba con la reducción de nitratos a nitritos para la detección de bacteriuria significativa. La utilización de estas dos pruebas juntas usando tiras reactivas, es la que hemos elegido dentro de los métodos químicos como objeto de estudio.

Otras técnicas instrumentales que han sido propuestas para ser utilizadas como sistemas de detección de bacteriuria, como bioluminiscencia, bioimpedimetría, electroquímicas, nefelometría de láser y otras no han alcanzado -

un uso generalizado. En esta línea de aparatos, los contadores de partículas, combinados con un analizador de distribución de partículas según su tamaño, parecen ser muy interesantes desde el punto de vista de su capacidad de detectar la presencia de microorganismos en la orina independientemente de su viabilidad (69, 114). Todavía quedan problemas por resolver, pero parece uno de los sistemas más prometedores.

Los aparatos automatizados que están disponibles comercialmente para diagnóstico rápido de muestras de orina y más utilizados son: MS-2, Autobac y Auto-Microbic System. Entre ellos hemos elegido para nuestro estudio el Auto-Microbic System debido a que nos parece más prometedor ya -/ que a diferencia de los otros, además de detectar la existencia de bacteriuria y proporcionar el recuento de unidades formadoras de colonias, identifica los microorganismos presentes sin necesitar previamente técnicas de obtención de cultivo puro. Esto lo consigue mediante la utilización de pocillos con medios selectivos en los cuales hay una -/ mezcla de sustratos y sustancias inhibidoras, que permite el crecimiento de un microorganismo determinado en cada pocillo. Por tanto, tiene capacidad para identificar cultivos mixtos y enumerar cada uno de los microorganismos presentes.

Junto con el desarrollo y aplicación práctica de téc

nicas mecánicas, electrónicas, inmunológicas y bioquímicas para el diagnóstico rápido de microorganismos en muestras clínicas, ha vuelto un renovado interés por las antiguas técnicas microscópicas, para este tipo de diagnóstico ya / que difícilmente se encontrará una técnica más barata y - que ofrezca resultados más rápidos. Así hemos seleccionado la tinción de Gram y Naranja de Acridina de orinas sin centrifugar para estudiarlas como sistema rápido en el diagnóstico de la infección urinaria.

- Técnicas rápidas en bacteriemia

El término bacteriemia indica la presencia de bacterias en la sangre y aunque puede sospecharse el diagnóstico basándose en datos clínicos, sólo se puede confirmar mediante el cultivo de la sangre. El término septicemia se / usa a menudo como sinónimo, pero este término implica otras manifestaciones clínicas además de la bacteriemia.

Anualmente se detectan alrededor de 200000 casos de septicemia asociados a una mortalidad de un 40-50 % (193, 196). Por lo que la bacteriemia es uno de los mayores problemas con que se enfrentan los Hospitales (30, 59, 65,66, 117, 129, 162, 163, 164) a pesar de los nuevos agentes antimicrobianos.

Respecto a su etiología han sido descritas numerosas bacterias como responsables de bacteriemias, en las que / junto a las generalmente adtimidas como más frecuentes (Enterobacterias, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, S. pneumoniae) (57, 58, 61, 64, 112, 117, 155, 162, 180, 179), aparecen bacteriemias producidas por ejemplo por Listeria monocytógenes, Salmonella sp, Campylobacter fetus, Aeromonas hydróphila y Corynebacterium sp (19, 74, 126, 139, 150, 187). También están aumentando en frecuencia las bacteriemias por anaerobios (117, 121).

En realidad cualquier bacteria reconocida como patógena puede producir septicemia. No obstante los microorganismos que con mayor frecuencia la producen son E. coli y S. aureus, según la mayoría de los autores (57, 58, 61, 64, 112, 117, 155, 162, 180, 197).

El hemocultivo continua siendo la pieza clave en el diagnóstico de bacteriemia, y su técnica y procedimientos básicos han sido adecuadamente descritos (149).

Al practicar los hemocultivos hay que tener en cuenta ciertos factores como: intermitencia de la bacteriemia, pequeño número en que se encuentran las bacterias en la sangre, propiedades antimicrobianas de los componentes de la sangre y existencia de agentes antimicrobianos en ella.

La bacteriemia puede ser intermitente o continua; debido a ello se deben realizar tres hemocultivos separados por intervalos de aproximadamente 1 hora. Se ha demostrado que las tasas de positividad tomando uno, dos o tres hemocultivos es de 80-90 y 99 % respectivamente (192).

Otra característica de la mayoría de las bacteriemias es el bajo número de bacterias por ml. de sangre (147,174). De ello podemos deducir que existe una relación directa entre el volumen de sangre procesado y los resultados positivos obtenidos (193). Así pues la extracción mínima de sangre por hemocultivo debe ser de 10 ml., excepto en los niños, donde la cantidad de sangre extraída será menor ya -/ que el número de bacterias por cultivo suele ser más alto y además sobre todo en niños pequeños no se puede extraer grandes volúmenes de sangre.

Desde hace tiempo se conoce que existen en la sangre factores inhibidores del crecimiento de bacterias, tales como anticuerpos, complemento, fagocitos o agentes microbianos. Ya hace años se recomendaba, para neutralizar estos efectos, la dilución de la sangre en caldo en proporción de 1/15-1/20 (99). En este sentido se dió un avance / con la incorporación del polianetol sulfonato sódico (SPS) a los medios de hemocultivos en la proporción de 0.025 % - ya que el SPS inhibe la fagocitosis, es anticomplementario,

previene de la opsonización e inactiva a los aminoglucósidos y antibióticos polipeptídicos (182). A pesar de la adición del SPS la dilución de la sangre en el medio de cultivo, no debe ser menor de 1/10.

Como el SPS desafortunadamente, no tiene efecto sobre otros antibióticos como las penicilinas, se puede añadir penicilinas a los frascos de hemocultivo para inactivar estos antibióticos, pero hay que tener mucho cuidado para evitar falsas bacteriemias por contaminación de la solución de penicilinas. Un nuevo sistema para neutralizar los antibióticos, fueron los dispositivos de resinas adsorbentes de antibióticos. Las ventajas de estos sistemas no están bien establecidas ya que los resultados obtenidos con ellos discrepan unos de otros (7, 8, 203). Otra forma de neutralizar los componentes antimicrobianos de la sangre, es mediante los sistemas de lisis-centrifugación (48, 124, 176, 200) de hematíes y leucocitos seguida de concentración de microorganismos por centrifugación o filtración y posterior cultivo del concentrado en medios sin antibiótico.

Con estas técnicas que pueden considerarse como un nuevo enfoque en el examen microbiológico de los hemocultivos, se han detectado bacteriemias en mayor número y menor tiempo que con frascos de hemocultivos; sin embargo, se detectaron significativamente menos bacteriemias por neumococo

y bacterias anaerobias y se obtuvo un número estadísticamente mayor de contaminaciones (79).

Otro de los problemas que surgen con los hemocultivos es el conocer con la mayor rapidez posible la existencia / de crecimiento bacteriano en un frasco de hemocultivo. El examen macroscópico y los subcultivos rutinarios, consumen mucho tiempo y los últimos son costosos, por lo que se han utilizado como alternativa medios bifásicos (76) y examen microscópico después de una tinción con naranja de acridina (23, 28, 109, 123, 133, 178). Otras técnicas como contra inmunolectroforesis, cromatografía de gases, impedancia , microcalorimetría o nefelometría de láser se encuentran to davía en fase experimental para su aplicación a la detec ción de bacteriemias (148).

Bactec: es un aparato automático que utiliza un sistema radiométrico para la detección del crecimiento bacteriano en frascos de hemocultivos con medio líquido. El prin cipio del sistema consiste en que el crecimiento bacteriano en caldo puede ser detectado midiendo el  $^{12}\text{CO}_2$  liberado du rante el metabolismo bacteriano de los nutrientes marcados radioactivamente. Los trabajos sobre el uso de este aparato ofrecen resultados de distinto signo (31, 92, 135, 140, 189) si bien parece que la mayor ventaja de su uso es la / automatización.

Recientemente ha aparecido otro sistema BAC-TEC no radiométrico que es el que hemos elegido para un estudio / como técnica rápida de detección del crecimiento en los -/ frascos de hemocultivos.

También hemos escogido para ser estudiada una técnica microscópica del exudado de petequia como técnica rápida en el diagnóstico de la sepsis meningocócica, enfermedad de curso rapidísimo y elevada mortalidad que da pocas oportunidades al diagnóstico microbiológico.

El aislamiento a partir de hemocultivos, identificación y determinación de la sensibilidad a los antibióticos es esencial que se haga con la mayor rapidez posible para el correcto tratamiento del enfermo con septicemia. Las -/ técnicas convencionales necesitan un mínimo de 24-48 horas para conocer la identificación y sensibilidad de una bacteria a partir del momento en que se ha detectado su crecimiento. Nosotros hemos evaluado un método directo a partir del frascos de hemocultivo crecido que nos permite conocer la identificación y/o sensibilidad en un tiempo más corto.

#### - Diagnóstico rápido en meningitis bacteriana aguda

La meningitis purulenta es una de las más serias infecciones que se encuentran en la práctica de las enferme-

dades infecciosas. Es causada fundamentalmente por bacterias y es una enfermedad que pone en peligro la vida del enfermo y puede causar importantes secuelas debido a lesiones permanentes en el sistema nervioso central. Por ello rara vez encontraremos una petición que deba ser atendida con mayor rapidez, que un examen bacteriológico de líquido cefalorraquídeo.

Las bacterias pueden alcanzar los meninges por diferentes vías, aunque la más frecuente es la hematógena. También pueden tener acceso como consecuencia de traumatismos craneales, neurocirugía y por extensión desde focos infecciosos próximos.

En lo que respecta a la etiología, N. meningitidis, S. pneumoniae y H. influenzae tipo b son las tres bacterias más frecuentes responsables de meningitis purulenta (3, 60, 67, 144, 156, 185), si bien cualquier bacteria puede producirla, observándose un cierto aumento de las meningitis -/ producidas por bacilos Gram negativos y Listeria monocytogenes (2, 60, 113, 181). La frecuencia relativa con que estos gérmenes producen meningitis tiene variaciones geográficas. Así en EEUU el Haemophilus influenzae es la bacteria - que con más frecuencia causa meningitis, sobre todo en niños; en Europa es N. meningitidis y por ejemplo en nuestro país es raro como agente causal de meningitis H. influenzae(144).

También existe una estrecha relación entre la edad del enfermo y la bacteria causante de la meningitis, así en los dos primeros meses de la vida, los microorganismos que -/ más frecuentemente la producen son E. coli, Streptococcus grupo B y Listeria monocytógenes (144).

Para el diagnóstico de meningitis purulenta, se debe extraer mediante punción lumbar, líquido cefalorraquídeo, el cual debe ser examinado cuidadosamente, ya que de los - datos que obtengamos va a depender fundamentalmente el diagnóstico de infección meníngea.

El recuento de leucocitos, y la determinación de glucosa y proteínas proporcionan rápida e importante información para establecer el diagnóstico de meningitis purulenta. El diagnóstico microbiológico se ha asentado tradicionalmente en estudios microscópicos y cultivos bacterianos adecuados. Los medios de cultivo y los métodos están suficientemente descritos (145).

El examen microscópico del líquido cefalorraquídeo - puede proporcionar resultados rápidos y seguros para el -/ diagnóstico de meningitis purulenta. Una tinción de Gram / del sedimento, observada cuidadosamente ya que la muestra puede contener muy pocos microorganismos, puede informarnos acerca de la presencia de bacterias, su morfología, su agru

pación y si son bacterias Gram positivas o Gram negativas.

Desde hace años se ha propuesto utilizar una tinción de naranja de acridina (98, 100, 105), con el fin de aumentar la posibilidad de detectar bacterias en caso de que -/ existan en número muy pequeño. En caso de positividad, deben teñirse con el Gram para confirmar los resultados.

La administración de antibióticos, previa al examen microbiológico, puede ser la causa de una tinción de Gram negativa y un cultivo estéril. Además con cierta frecuencia (115), hay meningitis purulenta en las que ni con el Gram ni con el cultivo se consigue demostrar el agente etiológico (70).

Debido a esto es de gran importancia utilizar técnicas rápidas que, a ser posible ofrezcan resultados en pocos minutos, que sean muy sensibles, y específicas y que sean de fácil realización. La contrainmunolectroforesis, aglutinación de látex, coaglutinación y ELISA son técnicas que cumplen estos requisitos.

Las tres primeras han sido ampliamente utilizadas para el diagnóstico rápido de meningitis producidas por N. meningitidis, S. pneumoniae, H. influenzae tipo b, y Streptococcus grupo B (32, 38, 43, 72, 73, 88, 131, 191, 202) .

Como la mayoría de los autores coinciden en que las técnicas de aglutinación tienen una mayor sensibilidad, son las que hemos elegido para nuestro estudio.

Las técnicas inmunoenzimáticas, han sido aplicadas recientemente a la detección de antígenos bacterianos. Puesto que N. meningitidis es la bacteria que con mayor frecuencia produce meningitis en nuestro país, hemos estudiado -/ una técnica ELISA para su diagnóstico.

Otras pruebas rápidas como la del Límulo o la cromatografía gas-líquido presentan inconvenientes, como dar resultados negativos con bacterias Gram positivas o no diferenciar las bacterias que detectan la primera; y complejidad, elevado coste de los aparatos y en ocasiones dificultad de interpretación la segunda, que hacen que no se hayan extendido como práctica habitual de laboratorio.

Para finalizar diremos que la utilización de técnicas rápidas, especialmente las de aglutinación, junto con técnicas tradicionales (tinción y cultivo) permitirán realizar el diagnóstico etiológico de meningitis purulenta en un gran número de casos.

Después de examinar las técnicas rápidas que existen en este momento para el diagnóstico de infecciones urina -

rias, septicemias y meningitis bacterianas agudas hemos -/  
elegido los siguientes métodos que nos han parecido los -/  
más útiles, sugestivos o prometedores y tecnológicamente -  
asequibles para nosotros.

- Planteamiento del trabajo

Infección urinaria

- a) Tinción de Gram de orina no centrifugada.
- b) Tinción de Naranja de Acridina de orina no centrifugada.
- c) Esterasa leucocitaria-reducción de nitratos a nitritos.
- d) Examen directo de orina para recuento de colonias e identificación de microorganismos con un método automático: Automicrobic System.

Septicemia

- a) Utilización de un sistema automático no radiométrico para la detección rápida del crecimiento bacteriano en hemocultivos.
- b) Examen del exudado de petequia como técnica rápida para el diagnóstico rápido de sepsis meningocóca.

- c) Técnica directa a partir del frasco de hemocultivo crecido para el diagnóstico rápido del agente etiológico y su sensibilidad a los cultivos.

Meningitis bacteriana aguda

- a) Técnica de coagulación para detección rápida - de antígenos bacterianos (N. meningitidis, S. pneumoniae y H. influenzae).
- b) Técnica de aglutinación de látex para detección - rápida de antígenos bacterianos (N. meningitidis, S. pneumoniae y H. influenzae).
- c) Técnica de ELISA para detección rápida de N. meningitidis utilizando un equipo comercial para N. gorrhoeae basándose en la existencia de reacciones cruzadas con otras Neisserias.

### III.MATERIAL Y METODOS

### III. MATERIAL Y METODOS

#### A. TECNICAS RAPIDAS EN INFECCION URINARIA

Los métodos rápidos más utilizados para el diagnóstico de la infección urinaria son:

- químicos.
- microscópicos.
- automatizados.

Nosotros hemos elegido:

- Dos métodos químicos utilizados conjuntamente: esterasa leucocitaria y reducción de nitratos a nitritos -/ (Comburtest) (Boehringer Mannheim).
- Dos métodos microscópicos utilizados individualmente: Gram y Naranja de Acridina.
- Un método automatizado: UID-3 (AMS System. McDnnell Douglas) (Figuras 1, 2, 3 y 4).
- Procesamiento de las orinas

a) Recogida de la orina: Se recoge de la parte media

de la micción (previo lavado de genitales) despreciando la primera y la última porción de orina.

Se utiliza para la recogida, un frasco de boca ancha con tapa de rosca, limpio y estéril.

La orina que se debe recoger es la primera de la mañana, que ha permanecido en la vejiga durante al menos 4-6 / horas. El envío al laboratorio debe ser inmediato.

En niños pequeños se puede recoger la orina utilizando bolsas de plástico estériles, que se acoplan al aparato genital. Tienen que se repuestas cada 1/2 hora.

b) Hemos procesado doscientas quince orinas procedentes de enfermos de nuestro Hospital con sospecha de infección urinaria.

A cada una de ellas se le practicaron las siguientes pruebas:

- Combur test.
- Gram
- Naranja de Acridina.
- UID-3 AMS.

Se utilizó como método de referencia un cultivo realizado en placas de CLED y Mac Conkey con asa calibrada -/ (0.002 ml.), practicándose a las 24 horas recuento de colonias e identificación de las colonias aisladas con el método Sceptor (Beckton Dickinson).

Se consideraron como cultivos positivos aquellos que tenían un recuento de colonias superior o igual a 50.000 / CFU/ml.

De las doscientas quince orinas estudiadas resulta - ron 130 positivas y 85 negativas.

c) También se efectuó un estudio experimental con -/ UID-3 AMS, utilizando las siguientes cepas ATCC:

- 1- Enterobacter cloacae ATCC 23355.
- 2- Serratia marcescens ATCC 8100.
- 3- Staphylococcus aureus ATCC 25923.
- 4- Streptococcus faecalis ATCC 29212.
- 5- Proteus vulgaris ATCC 13315.
- 6- Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853.
- 7- Citrobacter freundii ATCC 8090.
- 8- Escherichia coli ATCC 25922.

- 9- Yersinia enterocolitica ATCC 27729.
- 10- Acinetobacter calcoaceticus ATCC 19606.
- 11- Salmonella typhimurium ATCC 14028.
- 12- Candida albicans ATCC 14053.

Con cada una de estas cepas, se hicieron 5 diluciones al 1/10 a partir de una suspensión al 0.5 de MacFarland -/ ( $10^8$  CFU/ml.) en orina estéril previamente comprobada.

|                              |                  |
|------------------------------|------------------|
| Suspensión 0.5 de MacFarland | = $10^8$ CFU/ml. |
| Dilución 1                   | = $10^7$ CFU/ml. |
| Dilución 2                   | = $10^6$ CFU/ml. |
| Dilución 3                   | = $10^5$ CFU/ml. |
| Dilución 4                   | = $10^4$ CFU/ml. |
| Dilución 5                   | = $10^3$ CFU/ml. |

Tanto del 0.5 de MacFarland como de cada dilución -/ hecha se practicaron las siguientes técnicas:

- 1) Inoculación en tarjeta UID-3 AMS.
- 2) Siembra en placa de CLED y Mac Conkey con asa cali  
brada (0.002 ml.) para posterior recuento de colo-  
nias e identificación de las colonias crecidas -/  
(método Sceptor).

Las diluciones números 2, 3, 4 y 5, se inocularon -/ otra vez en tarjetas UID-3 AMS.

También se hicieron 5 diluciones de la misma forma - anteriormente expuesta, a partir de suspensiones al 0.5 de MacFarland que contenían dos bacterias mezcladas en proporciones iguales.

Las mezclas de bacterias utilizadas fueron:

- 1- Escherichia coli y Citrobacter freundii.
- 2- Enterobacter cloacae y Serratia marcescens.
- 3- Proteus vulgaris y Pseudomonas aeruginosa.
- 4- Staphylococcus aureus y Streptococcus faecalis.

Igualmente, de la suspensión al 0.5 de MacFarland y de cada dilución se practicó:

- 1) Inoculación en tarjetas UID-3AMS.
- 2) Siembra en placas de CLED y Mac Conkey para posterior recuento de colonias e identificación de las colonias crecidas.

Las diluciones 3, 4 y 5 (equivalentes aproximadamente a  $10^5$ ,  $10^4$  y  $10^3$  CFU/ml.) se inocularon tres veces más cada una en tarjetas UID-3 AMS.

Los resultados obtenidos en las cepas 9, 10 y 11 (Yersinia enterocolitica, Acinetobacter calcoaceticus y Salmonella typhimurium) se exponen separados del resto ya que las tarjetas UID-3 AMS no llevan medios de identificación para estas bacterias.

#### A.1. COMBUR TEST

##### - Material:

Tiras reactivas que entre otros parámetros, miden: esterasa leucocitaria y reducción de nitratos a nitritos, que son las reacciones que vamos a valorar.

En estas tiras, las zonas reactivas van protegidas - en su parte superior por una malla de nylon; en la parte inferior hay un papel absorbente y este conjunto va fijado a una lámina de plástico resistente.

##### - Método:

En una orina recogida correctamente y recientemente emitida se sumerge la tira reactiva.

Se elimina el exceso de orina contactando con el borde del recipiente.

La lectura del resultado se hace de la siguiente forma:

- a) Esterasa leucocitaria: a los 60-120 segundos. La reacción positiva se caracteriza por un viraje de color de marrón claro a violeta.
- b) Reducción de nitratos a nitritos: a los 30-60 segundos. En la reacción positiva aparece una coloración rosa-rojiza.

Se consideró Combur Test positivo, cuando fué positiva la esterasa leucocitaria, o la reducción de nitratos a nitritos, o ambas reacciones a la vez.

#### A.2. GRAM

La presencia de  $\geq 2$  bacterias por campo, observadas al microscopio óptico con objetivo de inmersión, en una preparación hecha en portaobjetos con una gota de orina recién emitida y sin centrifugar y teñida por el método de Gram significa la presencia de al menos  $10^5$  bacterias por ml. de orina.

- Material:

- Microscopio óptico.

- Aceite de inmersión.
- Violeta de genciana o Cristal violeta.
- Lugol (solución iodo iodurada).
- Alcohol acetona.
- Safranina.
- Agua.
- Portaobjetos de vidrio blanco.

- Método:

En un portaobjetos de 76x26 mm, de vidrio blanco, limpio y desengrasado, con un espesor de 1.2 mm., se hace -/ una extensión con una gota de orina sin centrifugar.

Se deja secar a temperatura ambiente.

Se fija la preparación al calor.

Después se tiñe según la técnica descrita por Hans - Christian Gram (1884) modificada por Hucker:

- 1- Cubrir la preparación con Cristal violeta durante 1 minuto.
- 2- Lavar con agua (escurrir el agua sin secar).

- 3- Cubrir con Lugol, 1 minuto.
- 4- Lavar con agua (escurrir el agua; no secar).
- 5- Decolorar durante 10-30 segundos con alcohol acetona.
- 6- Lavar con agua (escurrir el agua sin secar).
- 7- Cubrir la preparación con Safranina durante 30 segundos.
- 8- Lavar con agua y dejar que se seque el portaobjetos.

Una vez seca la preparación, observar con microscopio óptico utilizando el objetivo de inmersión y objetivos de x10 (1000 aumentos).

Observar un mínimo de veinte campos.

Se ha considerado la tinción de Gram positiva cuando se observaban en las condiciones antes descritas una o más bacterias por campo.

### A.3. NARANJA DF ACRIDINA

- Material:

- Portaobjetos de vidrio transparente de 76x26

por 1.2 mm de espesor.

- Solución de Naranja de Acridina al 0.01 % en solución tamponada a pH 4.
- Metanol.
- Estufa a 60° C.
- Microscopio de fluorescencia con dispositivo de epifluorescencia.

- Método:

Depositar una gota de orina recién emitida, sin centrifugar, en un portaobjetos limpio y desengrasado.

Secar en estufa a 60° C durante 1/2 hora.

Fijar con metanol 2 minutos.

Lavar el portaobjetos y dejar secar a temperatura ambiente.

Una vez seca la preparación, se mira al microscopio de fluorescencia con objetivo de 40 y oculares x10.

Se considera la tinción de Naranja de Acridina como

positiva si se observa una media de al menos una bacteria por campo, observando un mínimo de 20 campos.

#### A.4. UID-3 Automicrobic System

##### - Material:

- Tubos 12x75 mm estériles.
- Pipeta automática de 200 microlitros con puntas estériles desechables.
- Solución salina al 0.45 %.
- Soporte para tubos.
- Tubo fino de plástico para transferir la dilución de orina a la tarjeta.
- Unidad de vacío-selladora.
- Lector-incubador.
- Impresora.
- Sistema de extracción de los tubos de transferencia.
- Tarjetas UID-3

La tarjeta de identificación se utiliza para analizar microbiológicamente tres muestras diferentes de orina de modo simultáneo, partiendo directamente de la muestra de -

orina.

En la tarjeta existen 30 minicompartimentos o pocillos de crecimiento, repartidos en 3 secciones independientes con 10 pocillos cada una.

Cada sección sirve para el análisis de una muestra de orina.

Cada uno de los pocillos de cada sección lleva un medio de cultivo desecado, destinado al aislamiento de cada uno de los siguientes microorganismos:

- 1- Citrobacter freundii.
- 2- Serratia spp.
- 3- Klebsiella-Enterobacter spp.
- 4- Proteus spp.
- 5- E. coli.
- 6- Pseudomonas aeruginosa.
- 7- Levaduras.
- 8- Streptococcus grupo D.
- 9- Staphylococcus spp.

El pocillo 10 es un control de crecimiento.

Una vez reconstituídos los medios deshidratados de los pocillos, con el inóculo de orina diluída, cada uno de ellos revelará si ha existido o no crecimiento de la correspondiente bacteria, mediante una reacción única que será leída en el lector-incubador, el cual, la traducirá en presencia o ausencia de microorganismos en número clínicamente significativo.

El recuento total de microorganismos se basa en la tasa de crecimiento en los pocillos.

Las reacciones para los distintos microorganismos son las siguientes:

- C. freundii:

Componente activo: Rhamnosa.

Reacción: producción de ácido y crecimiento.

Reacción positiva: Azul. Con frecuencia turbidez.

Reacción negativa: azul claro.

- Serratia spp:

Componente activo: esculina y citrato férrico.

Reacción: hidrólisis enzimática de la esculina y precipitación de sales de hierro.

Reacción positiva: marrón oscuro a negro.

Reacción negativa: marrón.

- Klebsiella-Enterobacter spp:

Componente activo: Celobiosa-Inositol-Biotina.

Reacción: producción de ácido y crecimiento.

Reacción positiva: Precipitado verde lechoso.

Reacción negativa: verde claro.

- Proteus spp:

Componente activo: Urea.

Reacción: Degradación enzimática de la urea.

Reacción positiva: azul intenso.

Reacción negativa: azul claro.

- E. coli:

Componente activo: Lactosa. L-arabinosa.

Reacción: Producción de ácido y crecimiento.

Reacción positiva: azul lechoso.

Reacción negativa: azul claro o incolora.

- Pseudomonas aeruginosa:

Componente activo: Cetrimide.

Reacción: Crecimiento (tolerancia al cetrimide)

Reacción positiva: turbidez y con frecuencia -  
pigmentación característica.

Reacción negativa: sin color.

- Levaduras:

Componente activo: Glucosa (alta concentración)

Reacción: Producción de ácido.

Reacción positiva: azul fuerte. Con frecuencia turbidez.

Reacción negativa: azul claro o incolora.

- Streptococcus grupo D:

Componente activo: Esculina. Amonio férrico. - Citrato.

Reacción: Hidrólisis enzimática de la Esculina y precipitación de las sales de hierro.

Reacción positiva: precipitado negro.

Reacción negativa: color crema o incolora.

- Staphylococcus spp:

Componente activo: ClNa. DNA-verde de metilo.

Reacción: Producción de ácido y crecimiento.

Reacción positiva: púrpura azulado.

Reacción negativa: azul claro o sin color.

- Control de crecimiento:

Componente: Peptona y carbohidratos.

Reacción: Producción de ácido y crecimiento.

Reacción positiva: azul. Frecuentemente con - apariencia lechosa.

Reacción negativa: azul claro o sin color.

- Método:

a) Sacar la tarjeta Urine-3 de su envase y marcar -/ con rotulador los números de identificación de las orinas que van a ser analizadas, en la parte superior de la tarjeta.

b) Colocar en un tubo estéril de 12x75, 1.8 ml. de solución salina al 0.45 %, estéril, por cada muestra de orina.

c) Transferir a cada tubo 200 microlitros de las distintas orinas a analizar. Tapar los tubos y mezclar con agitador.

d) Colocar tres tubos, inoculados con orina según se señala en el paso anterior, en un soporte especial, en los lugares marcados con "1" para la orina que vaya a transferirse a la sección A, "4" para la orina de la sección B y "6" para la orina de la sección C.

e) Insertar en los tres orificios existentes en la parte inferior de la tarjeta, que corresponde a las secciones A, B y C , tres tubos de transferencia.

f) Colocar la tarjeta en el soporte especial, donde

se encuentran los tubos inoculados con orina, de forma que cada tubo de transferencia se sitúe dentro de uno de los tubos que contienen orina.

g) Colocar el soporte especial con la tarjeta, los tubos inoculados y los tubos de transferencia en el módulo de llenado, donde mediante un sistema de vacío, pasa el contenido del tubo de 12x75, a través del sistema de transferencia a su sección correspondiente (A, B o C) en la tarjeta.

h) Se saca la tarjeta del módulo de llenado y con un extractor se separan los tubos de transferencia de la tarjeta.

i) Inspeccionar que el llenado de los pocillos en la tarjeta, ha sido correcto (sin existencia de burbujas). En caso de que aparezcan burbujas en los pocillos, sacudir -/ enérgicamente la tarjeta para proceder a su eliminación.

j) Sellar los orificios donde estaban insertados los tubos de transferencia con varilla de plástico.

k) Colocar la tarjeta en el módulo Lector-incubador.

l) En un tiempo inferior a 13 horas, los resultados definitivos serán transcritos por la impresora.

El resultado incluirá para cada sección:

a) Recuento total de microorganismos. Nos dará tres tipos de resultados:

- 50000 CFU/ml.
- entre 1000 y 50000 CFU/ml.
- No crecimiento.

b) Identificación de los microorganismos que se han detectado por su crecimiento en los pocillos de la tarjeta

c) Si el control de crecimiento es positivo y los microorganismos presentes en la tarjeta no son identificados por los respectivos medios, el informe será "organismos no identificados".

#### B. TECNICAS RAPIDAS EN BACTERIEMIAS

Como métodos rápidos en bacteriemias, hemos seleccionado:

a) Un sistema automático, AutoMicrobic System (AMS), para obtener de hemocultivos positivos, partiendo directamente del frasco de hemocultivo, una rápida identificación y pruebas de sensibilidad a los antibióticos de los baci-

los Gram negativos (enterobacterias y bacilos no fermentadores) causantes de bacteriemias, en un tiempo sensiblemente inferior al de los métodos convencionales.

b) Observación al M.O. de exudados de petequia (teñidos con el método de Gram) de enfermos con sospecha de sepsis meningocócica, buscando diplococos Gram negativos con morfología compatible con Neisseria, obteniendo un diagnóstico de presunción en un tiempo muy inferior al hemocultivo.

c) Un sistema automático no radiométrico (BACTEC NR-660) para detección rápida del crecimiento de microorganismos en frascos de hemocultivo, midiendo el cambio en la composición de los gases existentes en dichos frascos (producción de CO<sub>2</sub> como indicador de actividad biológica).

#### B.1. SISTEMA AMS CON TARJETAS GNI, GNS

Como frasco de hemocultivo, se ha utilizado el frasco "Vacutainer" con 50 ml. de medio, cuya composición por litro es:

|                |       |
|----------------|-------|
| Quadtone       | 12 g. |
| Gelatina       | 12 g. |
| Cloruro sódico | 5 g.  |

|   |            |
|---|------------|
| Dextrosa  | 5 g.       |
| Bicarbonato sódico  | 2.2 g.     |
| Cisteina HCl  | 0.39 g.    |
| Polianetolsulfonato de sodio                                    | 0.30 g.    |
| Sulfonato magnésico   | 0.20 g.    |
| Fosfato sódico (Dibásico)                                       | 0.14 g.    |
| Sulfato de adenina  | 0.01 g.    |
| Glutamina   | 0.10 g.    |
| Acido paraaminobenzoico   | 0.05 g.    |
| Acido glutámico   | 0.05 g.    |
| Prolina   | 0.05 g.    |
| Hemina  | 0.005 g.   |
| Nicotinamida adenina di nucleótido                              | 0.00125 g. |
| Menadiona bisulfito de sodio                                    | 0.0026 g.  |
| Guanina HCl   | 0.00015 g. |
| Cocarboxilasa   | 0.00015 g. |
| Vitamina B <sub>12</sub>  | 0.00005 g. |
| Penicilinas para inactivar 4 unidades de Penicilina G potásica. |            |



En este frasco se introduce la sangre del enfermo -/ (aproximadamente 5 ml.) de forma aséptica, bien mediante jeringa y aguja estéril, o bien mediante dispositivo "frasco-brazo".

Una vez introducida la sangre en el frasco, se coloca la unidad de ventilación y se incuba en estufa a 37° C.

Hemos utilizado:

- 1- 84 hemocultivos crecidos macroscópicamente procedentes de la unidad de hemocultivos de nuestro Servicio.
- 2- 16 hemocultivos inoculados por nosotros con cepas ATCC (una bacteria por hemocultivo) y sangre humana estéril (2 ml.). La cantidad de bacterias inoculadas fué 0.5 ml. de una suspensión que contenía una dilución al  $1/10^6$  del 0.5 de MacFarland.

Las cepas ATCC utilizadas fueron:

- Salmonella typhimurium ATCC 14028.
- Serratia marcescens ATCC 8100
- Enterobacter cloacae ATCC 23355.

- Escherichia coli ATCC 25922.
- Klebsiella pneumoniae ATCC 13883.
- Proteus vulgaris ATCC 13315
- Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853.
- Enterobacter aerogenes ATCC 13048.
- Acinetobacter anitratus ATCC 19606.
- Shigella flexneri ATCC 12022.
- Citrobacter freundii ATCC 8090.
- Shigella sonnei ATCC 25931.
- Yersinia enterocolitica ATCC 27729.

Las tarjetas AMS utilizadas fueron la GNI y GNS.

La tarjeta GNI es similar a la descrita anteriormente (Infección urinaria) y contiene 30 pocillos en una sola sección. Veintinueve pocillos contienen pruebas bioquímicas y enzimáticas para identificación y el otro pocillo es el control de crecimiento

Los test bioquímicos son convencionales y no convencionales y su disposición en la tarjeta es la siguiente:

- 1- DP-300.
- 2- Glucosa (oxidasa).

- 3- Control de crecimiento.
- 4- Acetamida.
- 5- Esculina.
- 6- Plant Indican
- 7- Urea.
- 8- Citrato.
- 9- Malonato.
- 10- TDA.
- 11- Polymixina B.
- 12- Lactosa 10 %.
- 13- Maltosa.
- 14- Manitol.
- 15- Xilosa.
- 16- Rafinosa.
- 17- Sorbitol.
- 18- Sacarosa.
- 19- Inositol.
- 20- Adonitol.
- 21- p-Coumaric.
- 22- SH2
- 23- ONPG.
- 24- Ramnosa.
- 25- Arabinosa.
- 26- Glucosa (fermentación).
- 27- Arginina
- 28- Lisina.

29- Base control.

30- Ornitina.

Las reacciones que se producen en los pocillos son -  
las siguientes:

3- Control de crecimiento:

Componentes: Peptona, triptófano.

Reacción positiva: Turbidez.

Reacción negativa: claro.

29-Base Control

28-Lisina

30-Ornitina

27-Arginina:

Reacción: Decarboxilación.

Reacción positiva: azul.

Reacción negativa: amarillo, verde.

9-Malonato:

Reacción: Utilización del malonato.

Reacción positiva: verde oscuro, azul.

Reacción negativa: amarillo, verde.

10-TDA:

Reacción: Deaminación.

Reacción positiva: marrón.

Reacción negativa: amarillo.

1-DP-300:

Componente: 2,4,4' tricloro-2'-hidroxidofenil-  
eter.

Reacción: Fermentación en presencia de inhibi-  
dores específicos.

Reacción positiva: azul.

Reacción negativa: azul claro.

21-pCoumaric:

Componente: p-Coumaric.

Reacción: Fermentación en presencia de inhibi-  
dores específicos.

Reacción positiva: azul.

Reacción negativa: azul claro.

4-Acetamida:

Reacción: Utilización de la acetamida, produ-  
ciendo cambios en el pH.

Reacción positiva: azul.

Reacción negativa: verde.

5-Esculina:

Reacción: Hidrólisis.

Reacción positiva: precipitado negro.

Reacción negativa: claro.

2-Glucosa

12-Lactosa

13-Maltosa

14-Manitol

15-Xilosa:

Reacción: Oxidación.

Reacción positiva: azul.

Reacción negativa: azul claro.

11-Polymixin B:

Reacción: Crecimiento.

Reacción positiva: Turbidez.

Reacción negativa: claro.

23-ONPG:

Reacción: Hidrólisis.

Reacción positiva: azul fuerte.

Reacción negativa: azul claro.

22-SH2:

Componente: Tiosulfato sódico.

Reacción: Producción de SH<sub>2</sub> que reacciona con sales de hierro.

Reacción positiva: negro.

Reacción negativa: claro.

6-Plant-Indican:

Componente: Indoxil-B-D-glucosido.

Reacción: Escisión de un componente del grupo D-glucosido. El componente formado, en presencia de oxígeno produce un precipitado negro

Reacción positiva: precipitado negro.

Reacción negativa: claro.

16-Rafinosa

17-Sorbitol

18-Sacarosa

19-Inositol

20-Adonitol

24-Ramnosa

25-Arabinosa

26-Glucosa:

Reacción: Fermentación.

Reacción positiva: azul.

Reacción negativa: claro, ligera turbidez.

7- Urea:

Reacción: Liberación de amonio.

Reacción positiva: azul.

Reacción negativa: verde.

8- Citrato:

Reacción: Utilización del citrato.

Reacción positiva: verde oscuro, azul.

Reacción negativa: amarillo verdoso.

La tarjeta GNS es similar a las anteriores. Con 30 pocillos en una sola sección. Cada pocillo contiene una cantidad determinada de antibiótico junto con un medio de cultivo microbiológico.

Contiene 11 antibióticos distintos. Siete de ellos -/ con tres diluciones (cada una en un pocillo distinto) y cuatro con 2 diluciones. En total ocupan 29 pocillos. El pocillo restante es el control de crecimiento.

Los antibióticos empleados y sus diluciones en microgramos/ml. son:

Amikacina            2, -8, -32

Ampicilina           0.5, -4, -32

Carbenicilina        32, -128

|               |              |
|---------------|--------------|
| Cefamandol    | 2, -16, -128 |
| Cefoxitina    | 2, -16, -128 |
| Cefalotina    | 2, -16       |
| Cloranfenicol | 2, -8        |
| Gentamicina   | 0.5, -2, -8  |
| Tetraciclina  | 2, -8, -32   |
| Tobramicina   | 0.5, -2, -8  |
| Cotrimoxazol  | 1/19, -2/38  |

Al inocular la tarjeta, se rehidrata y diluye al antibiótico existente en cada pocillo alcanzando la concentra-ción predeterminada.

- Método:

Del frasco de hemocultivo crecido, se extraen con jeringa estéril 5-10 ml. y se centrifugan a 800 r.p.m. durante 3-5 minutos, para sedimentar los glóbulos rojos.

Centrifugar el sobrenadante a 2500 r.p.m.. durante 10 minutos, para sedimentar las bacterias (del sedimento bacteriano se hace una extensión y se tiñe con el método de Gram para ver la morfología de las bacterias).

Se desecha el sobrenadante y al sedimento (constituf-

do por bacterias), se le añade solución salina al 0.45 % - hasta conseguir una turbidez equivalente al nº 1 de MacFarland.

Con la suspensión 1 de MacFarland, se inocula una tarjeta GNI (Gram Negative Identification) del AMS System. De esta suspensión, se transfieren 100 microlitros a 1.8 ml. de solución salina al 0.45 % y con esta suspensión, se inocula una tarjeta GNS (Gram Negative Susceptibility) de AMS System.

La inoculación de las tarjetas se hace de la siguiente forma:

- 1) Sacar la tarjeta GNI o GNS de su envase.
- 2) Identificar la tarjeta, marcando con un rotulador en el lugar apropiado situado en la parte superior izquierda de la tarjeta.
- 3) Colocar un tubo estéril de 12x75 mm. conteniendo / una suspensión al 1 de MacFarland para GNI o la -/ suspensión diluída para GNS, en el soporte especial AMS.
- 4) Insertar un tubo acodado de transferencia en el orificio situado en un lateral de la tarjeta.
- 5) Colocar la tarjeta en el soporte especial AMS de -

forma que el tubo de transferencia quede dentro - del tubo de 12x75 mm. que contiene la suspensión de la bacteria.

- 6) Llevar el conjunto anterior al módulo de llenado, donde mediante un sistema de vacío, se transfiere la suspensión de bacterias a los compartimentos - de la tarjeta.
- 7) Una vez llenos los pocillos, se coloca la tarjeta en el módulo de sellado, que corta el tubo de transferencia a ras del borde de la tarjeta, quedando - esta sellada.
- 8) Comprobar que no existen burbujas de aire en los - pocillos de la tarjeta. En caso de que existan, se eliminan sacudiendo enérgicamente la tarjeta. Una vez eliminadas las burbujas, se coloca en el módulo Lector-incubador. Este módulo contiene cuatro directorios, con capacidad de 30 tarjetas cada -/ uno, es decir, 120 tarjetas pueden ser incubadas - simultáneamente.

En la tarjeta GNI, los patrones bioquímicos son analizados automáticamente.

En la tarjeta GNS, los pocillos son leídos automáticamente, detectando la presencia o ausencia de crecimiento .

En base a estas lecturas, se obtienen los resultados que se expresan en CMI y en términos de S (sensible), MS / (moderadamente sensible) y R (resistente).

El módulo Computador, contiene la memoria que opera todo el sistema.

Una vez finalizado el proceso necesario para obtener los resultados, estos se imprimen automáticamente.

Mediante una terminal de datos, los resultados preliminares y finales, pueden solicitarse en cualquier momento del ciclo de la prueba, imprimiéndolo en caso de interés.

## B.2. EXUDADOS DE PETEQUIAS

Se han estudiado los exudados de petequias de 95 enfermos con sospecha de sepsis meningocócica.

El material y métodos de la tinción de Gram han sido descritos en el apartado correspondiente de la Infección - Urinaria.

De las lesiones que aparecen en la piel de los enfermos con sospecha de sepsis meningocócica (petequia) se obtiene mediante punción con lanceta estéril (previa desin -

fección con solución alcohólica de Clorhexidina) un exudado con el que se hace una impresión en un portaobjetos. Es necesario tener cuidado para evitar que se produzca hemorragia.

El portaobjetos con la impresión, se fija al calor y se hace un tinción de Gram. Posteriormente se mira con detenimiento al M.O. La observación debe ser prolongada buscando diplococos Gram negativos con morfología compatible con Neisseria.

### B.3. BACTEC NR-660 (Figuras 5, 6 y 7)

Bactec NR-660, es un aparato para lectura automática de hemocultivos.

Los frascos de hemocultivo colocados en una bandeja especial, se colocan en la cámara de lectura. Con un sistema de agujas que se introducen a través del tapón perforable del frasco se efectúa la medida de la producción de  $-/CO_2$  como índice de la actividad biológica. La lectura se realiza con un analizador de infrarrojos y si los valores / son superiores a un nivel preestablecido, el aparato los detecta como positivos. Los tapones de los frascos son desinfectados durante la lectura mediante luz ultravioleta y las agujas son esterilizadas por calor después de medir cada -/

frasco.

El aparato hace una programación de estancia de frascos que puede ser de 5 ó 7 días. Para los exámenes diarios, el aparato indica qué bandeja hay que cargar en la cámara de lectura y el resto de la lectura es automático. Un listado con los frascos positivos se imprime automáticamente al final de la lectura.

Así pues el NR-660 proporciona exámenes automatizados, organiza la permanencia de los frascos y proporciona resultados diarios.

- Material:

Bactec NR-660 que tiene las siguientes partes:

a) Módulo de lectura automática que utiliza como tecnología, espectrofotometría infrarroja.

b) Incubador, agitador, capaz para 600 viales colocados en bandejas especiales.

c) Computadora con video terminal y teclado.

d) Impresora.

Frascos de hemocultivo Bactec NR6A (aerobios) y NR7A (anaerobios), cuya composición es la siguiente:

|                         | <u>NR6A</u> | <u>NR7A</u> |
|-------------------------|-------------|-------------|
| Agua destilada          | 30 ml.      | 30 ml.      |
| Tryptic Soy Broth       | 2.75 %      | 2.2 %       |
| Hemina                  | 0.0005 %    | 0.0005 %    |
| Vitamina K              | 0.00005 %   | 0.00005 %   |
| Dextrosa                | 0.06 %      | 0.2 %       |
| Sacarosa                | 0.0835 %    | --          |
| SPS                     | 0.025 %     | 0.025 %     |
| Extracto de levadura    | 0.25 %      | 0.40 %      |
| Tejidos digeridos       | --          | 0.05 %      |
| Citrato sódico          | --          | 0.02 %      |
| Thiol                   | --          | 0.115 %     |
| Vitamina B <sub>6</sub> | 0.001 %     | --          |

Dos botellas con mezcla de gases:

Mezcla aerobia: 2.5 % CO<sub>2</sub> y resto aire seco.

Mezcla anaerobia: 5 % CO<sub>2</sub> y resto N<sub>2</sub>

- Método:

La extracción de sangre, se hace como en las técnicas convencionales y se inoculan entre 3 y 5 ml. de sangre por frasco aerobio y anaerobio.

Una vez hecha la extracción se colocan los frascos en bandejas especiales separando los aerobios de los anaerobios. Se meten en el incubador, en el dispositivo rotatorio situado en la parte inferior del incubador. Para la lectura diaria, después de cambiar las agujas y chequear el aparato, éste va indicando el orden y ritmo con que hay que colocar las bandejas que contienen los frascos en la cámara de incubación, donde se hace la lectura automáticamente y / una vez terminada se imprimen los resultados obtenidos.

Los frascos positivos, se sacan de la bandeja y con ellos se realizan las técnicas microbiológicas destinadas a identificar y conocer la sensibilidad de los microorganismos que han crecido en las botellas.

C. LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO

Hemos utilizado en este estudio de líquidos cefalorraquídeos, como técnicas rápidas:

- Coaglutinación.

- Látex.

- ELISA.

Debido a que el número de meningitis purulentas en nuestro Hospital es bajo, hemos hecho un estudio experimental, para ver la eficacia de Coaglutinación y Látex en infecciones por N. meningítidis, H. influenzae, S. pneumoniae y la eficacia de un método ELISA en infecciones por / N. meningitidis.

#### C.1. COAGLUTINACION

La técnica de la coaglutinación se basa en que anticuerpos específicos frente a S. pneumoniae (83 tipos), H. influenzae tipo b y N. meningitidis (A, B, C, Y, W35), obtenidos en conejos, se unen a la proteína A de la superficie de Estafilococos no viables. Cuando un líquido cefalorraquídeo que contiene Ag de alguno de los microorganismos antes citados se enfrenta al reactivo, se produce una reacción entre los Ag capsulares de la bacteria y los Ac específicos del reactivo obteniéndose una aglutinación visible a simple vista.

- Material:

- L.C.R.
- Reactivo CSF.
- Portaobjetos, asa de cultivo, pipeta Pasteur.
- Baño maría a 80° C.
- Reloj avisador.
- Cepas de:
  - N. meningitidis.
  - H. influenzae.
  - S. pneumoniae.

- Método:

Las muestras de L.C.R. deben ser calentadas en baño de agua a 80° C durante 5 m. y dejarlas enfriar.

Si existen hematíes en la muestra debe centrifugarse.

- Técnica:

Colocar una gota de cada reactivo previamente agitado en cada uno de los círculos marcados en el portaobjetos. / Añadir una gota de L.C.R. previamente calentado y centrifugado, a cada gota de reactivo.

Mezclar las gotas con un asa de plástico desechable , usando un asa para cada gota de reactivo. Girar el portaobjetos, inclinándolo durante 1 m. La temperatura de la reacción debe ser la temperatura ambiente.

El tiempo de lectura es de 1-2 m.

- Resultados:

- Positivo: Cuando existe una reacción de aglutinación fuerte y rápida en uno de los reactivos y no existe en el resto.
- Negativo: No existe reacción de aglutinación en ninguno de los reactivos.
- No interpretable: Cuando se produce una reacción de aglutinación fuerte e intensa en más de un reactivo. La muestra no se puede identificar por CSF coaglutinación.

## C.2. LATEX

Este método consiste en partículas de látex sensibilizadas (unidas) con antisuero específico que reaccionan con muestras de L.C.R. que contienen antígenos capsulares bacterianos, produciéndose una aglutinación visible.

Las partículas de látex están sensibilizadas con antisueros frente a:

83 serotipos de S. pneumoniae.

N. meningitidis serogrupos A, B, C, Y, W135.

H. influenzae tipo b.

- Material:

Reactivo de látex para las bacterias antes enumeradas

Control de látex de conejo (para S. pneumoniae) o de caballo (para H. influenzae o N. meningitidis).

Controles positivos para:

- S. pneumoniae.
- H. influenzae.
- N. meningitidis.

Controles negativos

Diluyente

Cepas de:

- S. pneumoniae.
- H. influenzae.
- N. meningitidis.

Micropipeta-Centrífuga-agitador rotador (100-180 rpm)

- Muestra:

L.C.R.

Si la muestra es turbia, debe ser centrifugada durante 10 ó 15 minutos, para aclararlo.

- Método:

Para S. pneumoniae y H. influenzae:

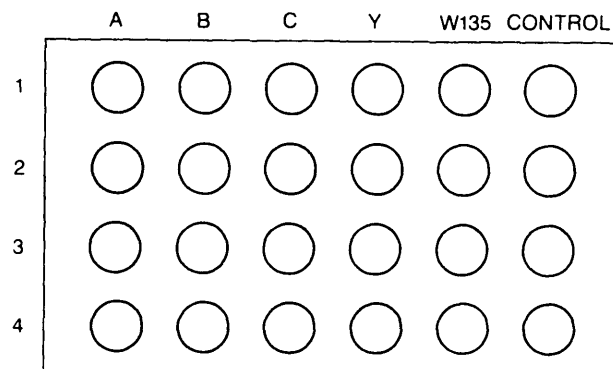
|   |   |   |   |   |   |
|---|---|---|---|---|---|
| A | ① | ② | ③ | ④ | ⑤ |
| B | ① | ② | ③ | ④ | ⑤ |

- 1) Colocar 50 microlitros del control positivo correspondiente en los pocillos A-1 y B-1.
- 2) Colocar 50 microlitros del control negativo en los pocillos A-2 y B-2.
- 3) Colocar 50 microlitros de la muestra problema en los pocillos A-3 y B-3 (más muestra problema se puede colocar en los pocillos A-4, B-4 y A-5, B-5)
- 4) Añadir 10 microlitros del reactivo de látex correspondiente en todos los pocillos de la línea A.
- 5) Añadir 10 microlitros del Control de látex correspondiente en todos los pocillos de la línea B.
- 6) Mezclar el contenido de los pocillos con un palillo.

7) Colocar la placa en el rotor-agitador 10 minutos.

8) Leer si hay o no aglutinación.

Para N. meningítidis:



1) Colocar 50 microlitros del control positivo en cada pocillo de la línea 1.

2) Colocar 50 microlitros del control negativo en cada pocillo de la línea 2.

3) Colocar 50 microlitros de la muestra en todos los pocillos de la línea 3.

4) Colocar 5 microlitros de la muestra más 50 microlitros de diluyente en todos los pocillos de la línea 4.

5) En cada pocillo de la columna A, añadir 10 microlitros de reactivo de látex N. meningítidis A.

6) En cada pocillo de la columna B, añadir 10 microlitros

tros del reactivo de látex N. meningitidis B.

- 7) Las mismas cantidades de reactivo de látex de N. meningitidis C, Y, W135 y Control de látex se colocan en las columnas C, Y, W135 y Control.
- 8) Colocar la placa en el rotor-agitador durante 10 minutos.
- 9) Leer buscando la aparición de la aglutinación.

- Lectura:

Los controles positivos deben dar aglutinación con - los reactivos de látex correspondientes y negativos con -/ los controles de látex. Los controles negativos no deben - dar aglutinación ni con los reactivos de látex ni con los controles de látex.

Si la muestra control (cumpliéndose las condiciones anteriores) aglutina con algún reactivo de látex, se considerará positiva para ese reactivo de látex, siempre que no dé aglutinación con el control de látex.

### C.3. INMUNOENSAYO ENZIMATICO DE FASE SOLIDA PARA DETEC CIÓN DE N. GONORRHOEAE

Las esferas tratadas con anticuerpos específicos, se incuban con la muestra. Si ésta tiene antígeno, se adsorbe

a la esfera. Después de la eliminación del material no unido, la esfera se incuba con un anticuerpo anti-N. gonorrhoeae, el cual reacciona con los antígenos de la esfera.

A continuación, la esfera se incuba con un conjugado anticuerpo-enzima (que contiene peroxidasa de rábano picante), el cual reacciona con el complejo antígeno-anticuerpo de la esfera.

La presencia de la enzima en la superficie de la esfera, se pone de manifiesto incubando la esfera lavada con O-fenilendiamina (OPD) que contiene peróxido de hidrógeno.

Después de la incubación, se desarrolla un color amarillo-anaranjado con intensidad proporcional a la cantidad de antígeno adsorbido en la esfera.

Se utilizan controles positivos y negativos y la absorción de los controles y las muestras, se determinan con un espectrofómeto con longitud de onda a 492 nm.

- Material:

- Esferas tratadas con anticuerpos.

- Anticuerpo contra N. gonorrhoeae (en conejo).

- Anticuerpo contra IgG de conejo (en cabra)-conjuga

do de peroxidasa (rábano picante).

- Control positivo: extracto de N. gonorrhoeae.
- Control negativo: solución salina tamponada.
- OPD: (O-fenilendiamina) con su diluyente.
- Acido sulfúrico 1N.

Para la preparación de muestras se requiere el uso de torundas apropiadas, a las que una vez impregnadas con la muestra, se añade 1 ml. de tampón, en el que la torunda -/ permanece sumergida 2 minutos. A continuación se exprime - la torunda contra las paredes del tubo y se desecha de manera apropiada.

- Método:

Utilizar placas especiales con pocillos apropiados.

Primera incubación:

Poner 200 microlitos de los controles cada uno en un pocillo distinto (tres controles negativos y un control positivo).

Poner 200 microlitros de cada muestra en un pocillo - distinto para cada una.

Colocar una esfera tratada con anticuerpos dentro de cada pocillo que contiene una muestra o control.

Cubrir con un folio adhesivo e incubar a  $37^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$  durante  $45 \pm 3$  minutos.

Retirar los folios y lavar cada esfera cuatro veces - con 4-6 ml. de agua destilada o desionizada.

Segunda incubación:

Pipetear dentro de cada pocillo de reacción, 200 mi - crolitros de anticuerpo contra N. gonorrhoeae.

Cubrir con un folio adhesivo e incubar a  $37^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$  durante  $45 \pm 3$  minutos.

Retirar los folios adhesivos y lavar cada esfera cuatro veces con agua destilada o desionizada.

Tercera incubación:

Pipetear dentro de cada pocillo 200 microlitros de anticuerpo contra IgG-conjugado de peroxidasa de rábano picante.

Cubrir con un folio adhesivo e incubar a  $37^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$  durante  $45 \pm 3$  minutos.

Retirar el folio adhesivo y lavar cada esfera cuatro veces como en apartados anteriores.

- Desarrollo de color:

Preparar la solución de OPD (una tableta en 5 ml. de diluyente).

Transferir las esferas a tubos de ensayo debidamente identificados.

Pipetear 300 microlitros de solución de OPD dentro de cada tubo.

Incubar durante  $30 \pm 1$  minuto a temperatura entre 15 y 30° C.

Añadir a cada tubo 1 ml. de ácido sulfúrico 1N. Agitar y mezclar.

- Lectura:

Ajustar el blanco del espectrofotómetro.

Determinar la absorción a 492 nm.

Las muestras con valores de absorción iguales o mayores que un valor límite, se consideran positivas.





Figura 1.- Automic System (AMS). Módulo de sellado y llenado. Módulo lector-incubador. Módulo computador. Terminal de datos. Impresora.



Figura 2.- Módulo de sellado y llenado

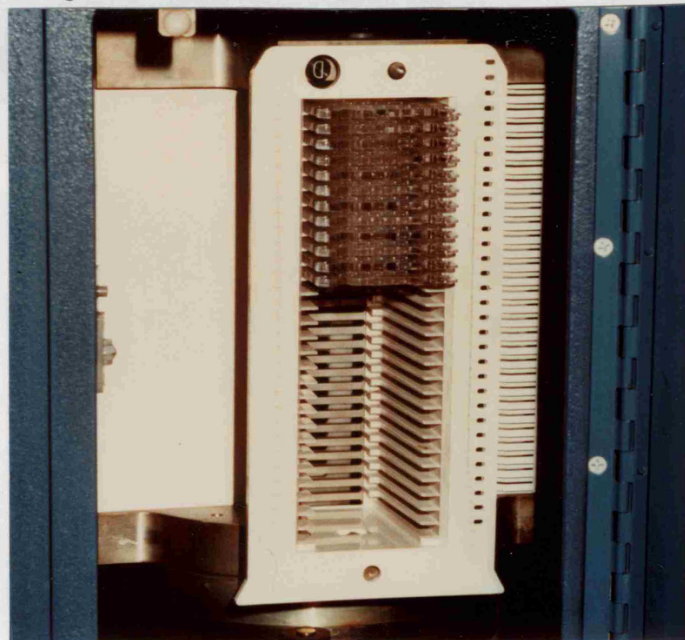


Figura 3.- Módulo lector-incubador

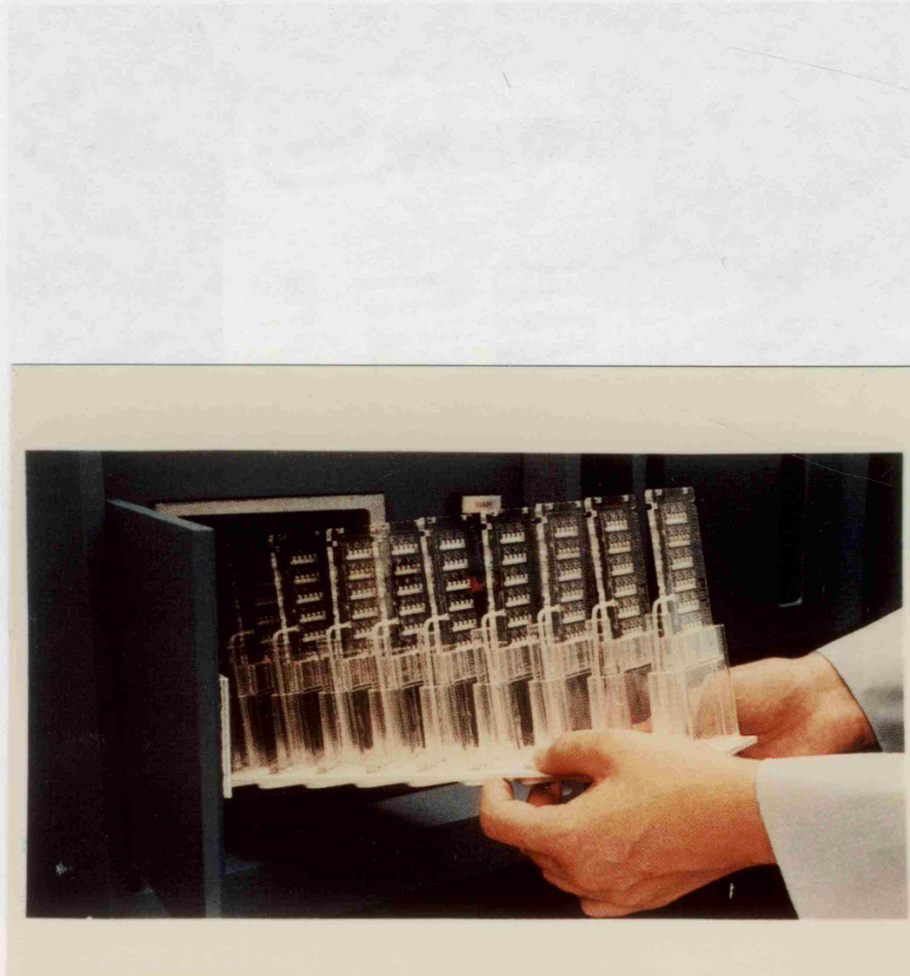


Figura 4.- Tarjetas GNI en soporte destinado para ellas.

Figura 5.- Bandeja especial para frascos de mano cultivos Bacter.

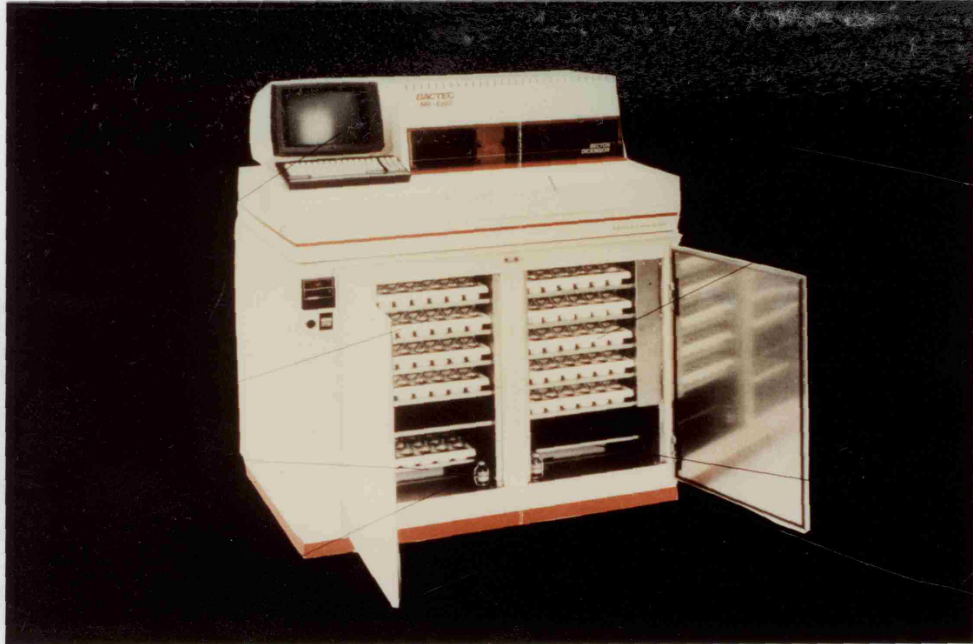


Figura 5.- Bactec NR-660 compuesto de cámara de lectura, incubador-agitador y computadora con video terminal y teclado.

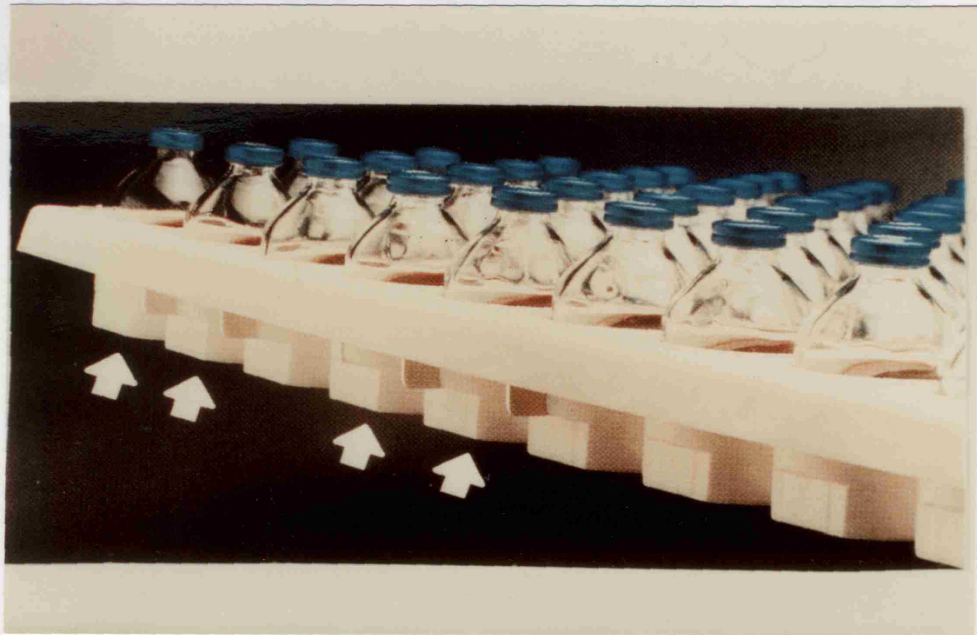


Figura 6.- Bandeja especial para frascos de hemocultivos Bactec.

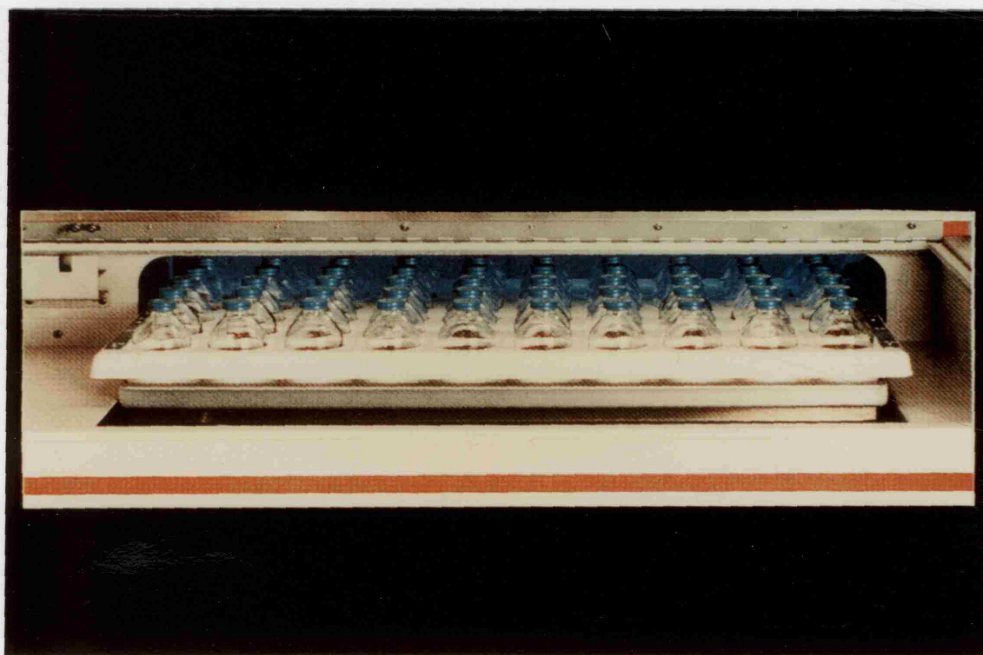


Figura 7.- Bandeja con frascos de hemocultivo Bactec en la cámara de lectura.

#### IV . RESULTADOS

#### IV. RESULTADOS

Los resultados obtenidos con doscientas quince ori - nas procedentes de enfermos de nuestro Hospital con sospe - cha de infección urinaria se exponen en las Tablas 1, 2, 3 y 4. En ellas se hace un estudio comparativo entre el méto - do tomado como referencia (cultivo realizado en placas de CLED y Mac Conkey con asa calibrada) y las técnicas de Com - bur test, Gram, Naranja de Acridina y UID-3 AMS (recuento de colonias).

También se expresa la sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo de los diferen - tes métodos.

TABLA 1.- Resultados comparativos entre Combur test y Método de Referencia

| COMBUR TEST | Método de referencia |          |
|-------------|----------------------|----------|
|             | POSITIVO             | NEGATIVO |
| Positivo    | 111                  | 20       |
| Negativo    | 19                   | 65       |
|             | 130                  | 85       |

Sensibilidad: 85 %; Especificidad: 76 %; Valor predic - tivo positivo: 84 %; Valor predictivo negativo: 77 %

TABLA 2.- Resultados comparativos entre la tinción de Gram y el Método de Referencia.

|            | Método de Referencia |          |
|------------|----------------------|----------|
|            | POSITIVO             | NEGATIVO |
| T. DE GRAM |                      |          |
| Positivo   | 123                  | 4        |
| Negativo   | 7                    | 81       |
|            | 130                  | 85       |

Sensibilidad: 94 %; Especificidad: 95 %; Valor predictivo positivo: 96 %; Valor predictivo negativo: 92 %

TABLA 3.- Resultados comparativos entre la tinción de Naranja de Acridina y el Método de Referencia

|                     | Método de Referencia |          |
|---------------------|----------------------|----------|
|                     | POSITIVO             | NEGATIVO |
| NARANJA DE ACRIDINA |                      |          |
| Positivo            | 124                  | 9        |
| Negativo            | 6                    | 76       |
|                     | 130                  | 85       |

Sensibilidad: 95 %; Especificidad: 89 %; Valor predictivo positivo: 93 %; Valor predictivo negativo: 92 %

TABLA 4.- Resultados comparativos entre el recuento de colonias obtenido con UID-3 AMS y el Método de Referencia

| UID-3 AMS<br>(recuento colonias) | Método de Referencia |          |
|----------------------------------|----------------------|----------|
|                                  | POSITIVO             | NEGATIVO |
| Positivo                         | 127                  | 2        |
| Negativo                         | 3                    | 83       |
|                                  | 130                  | 85       |

Sensibilidad: 97 %; Especificidad: 97 %; Valor predictivo positivo: 98 %; Valor predictivo negativo: 96 %

En las Tablas 5.1, 5.2, 5.3, 6.1, 6.2, 6.3, 7.1, 7.2, 7.3, 8.1, 8.2 y 8.3, las muestras de orina que resultaron positivas, se dividieron en tres grupos: uno con las muestras en que se identifica un sólo bacilo Gram negativo; -/ otro con las que se aislan sólo cocos Gram positivos o sólo levaduras y un tercer grupo, con las muestras polimicrobianas.

En éstas Tablas, se exponen los resultados positivos y negativos de éstos grupos, comparando el método de referencia con Combur Test, Gram, Naranja de Acridina y UID-3 AMS (identificación).

TABLA 5.1.- Grupo bacilos Gram negativos

| COMBUR TEST | Método de Referencia |    |
|-------------|----------------------|----|
|             | POSITIVO             | %  |
| Positivo    | 75                   | 86 |
| Negativo    | 12                   | 14 |
|             | <u>87</u>            |    |

TABLA 5.2.- Grupo cocos Gram positivo o levaduras

| COMBUR TEST | Método de Referencia |    |
|-------------|----------------------|----|
|             | POSITIVO             | %  |
| Positivo    | 16                   | 80 |
| Negativo    | 4                    | 20 |
|             | <u>20</u>            |    |

TABLA 5.3.- Grupo muestras polimicrobianas

| COMBUR TEST | Método de Referencia |    |
|-------------|----------------------|----|
|             | POSITIVO             | %  |
| Positivo    | 20                   | 86 |
| Negativo    | 3                    | 14 |
|             | <u>23</u>            |    |

Porcentajes de resultados positivos y negativos obtenidos con Combur test, comparado con el Método de Referencia en 3 grupos de muestras positivas de orina: 1) Bacilos Gram (-); 2) Cocos Gram (+) o levaduras y 3) Muestras polimicrobianas.

TABLA 6.1.- Grupo bacilos Gram negativos

|         |          | Método de Referencia |    |
|---------|----------|----------------------|----|
|         |          | POSITIVO             | %  |
| T. GRAM | Positivo | 81                   | 93 |
|         | Negativo | 6                    | 7  |
|         |          | <u>87</u>            |    |

TABLA 6.2.- Grupo cocos Gram positivos o levaduras

|         |          | Método de Referencia |    |
|---------|----------|----------------------|----|
|         |          | POSITIVO             | %  |
| T. GRAM | Positivo | 19                   | 95 |
|         | Negativo | 1                    | 5  |
|         |          | <u>20</u>            |    |

TABLA 6.3.- Grupo muestras polimicrobianas

|         |          | Método de Referencia |     |
|---------|----------|----------------------|-----|
|         |          | POSITIVO             | %   |
| T. GRAM | Positivo | 23                   | 100 |
|         | Negativo | 0                    | -   |
|         |          | <u>23</u>            |     |

Porcentaje de resultados positivos y negativos obtenidos con tinción de Gram, comparado con el Método de Referencia en 3 / grupos de muestras positivas de orina: 1) Bacilos Gram (-) ; 2) Cocos Gram (+) o levaduras y 3) Muestras polimicrobianas.

TABLA 7.1.- Grupo de bacilos Gram negativos

|                     |          |                      |    |
|---------------------|----------|----------------------|----|
| NARANJA DE ACRIDINA |          | Método de Referencia |    |
|                     |          | POSITIVO             | %  |
|                     | Positivo | 83                   | 95 |
|                     | Negativo | 4                    | 5  |
|                     |          | <u>87</u>            |    |

TABLA 7.2.- Grupo cocos Gram positivos o levaduras

|                     |          |                      |    |
|---------------------|----------|----------------------|----|
| NARANJA DE ACRIDINA |          | Método de Referencia |    |
|                     |          | POSITIVO             | %  |
|                     | Positivo | 19                   | 95 |
|                     | Negativo | 1                    | 5  |
|                     |          | <u>20</u>            |    |

TABLA 7.3.- Grupo muestras polimicrobianas

|                     |          |                      |    |
|---------------------|----------|----------------------|----|
| NARANJA DE ACRIDINA |          | Método de Referencia |    |
|                     |          | POSITIVO             | %  |
|                     | Positivo | 22                   | 95 |
|                     | Negativo | 1                    | 5  |
|                     |          | <u>23</u>            |    |

Porcentaje de resultados positivos y negativos obtenidos con Tinción de Naranja de Acridina comparados con el Método de Referencia, en 3 grupos de muestras positivos de orina: 1) Bacilos Gram (-); 2) Cocos Gram (+) o levaduras y 3) Muestras polimicrobianas.

TABLA 8.1.- Grupo de bacilos Gram negativos

| VITEK URINE-3 | Método de Referencia |    |
|---------------|----------------------|----|
|               | POSITIVO             | %  |
| Positivo      | 81                   | 93 |
| Negativo      | 6                    | 7  |
|               | <u>87</u>            |    |

TABLA 8.2.- Grupo cocos Gram positivos o levaduras

| VITEK URINE-3 | Método de Referencia |     |
|---------------|----------------------|-----|
|               | POSITIVO             | %   |
| Positivo      | 20                   | 100 |
| Negativo      | 0                    | -   |
|               | <u>20</u>            |     |

TABLA 8.3.- Grupo muestras polimicrobianas

| VITEK URINE-3 | Método de Referencia |    |
|---------------|----------------------|----|
|               | POSITIVO             | %  |
| Positivo      | 19                   | 82 |
| Negativo      | 4                    | 18 |
|               | <u>23</u>            |    |

Porcentaje de identificaciones correctas obtenidas con Vitek Urine-3, comparado con el Método de Referencia en 3 grupos de muestras positivas de orina: 1) Bacilos Gram (-); 2) Cocos - Gram (+) o levaduras y 3) Muestras polimicrobianas.

TABLA 9.- Orinas directas UID-3 AMS. Horas empleadas en la identificación y recuento de colonias

| HORAS                   | BG(-) | Coco G (+) | Levad. | Polimic. | TOTAL | T.HORAS |
|-------------------------|-------|------------|--------|----------|-------|---------|
| 2                       | 2     | 0          | 0      | 0        | 2     | 4       |
| 3                       | 4     | 1          | 0      | 1        | 6     | 18      |
| 4                       | 11    | 2          | 1      | 0        | 14    | 56      |
| 5                       | 17    | 0          | 1      | 6        | 24    | 120     |
| 6                       | 11    | 1          | 1      | 1        | 14    | 102     |
| 7                       | 6     | 0          | 1      | 4        | 11    | 77      |
| 8                       | 6     | 0          | 3      | 1        | 10    | 80      |
| 9                       | 7     | 1          | 3      | 3        | 14    | 126     |
| 10                      | 4     | 2          | 0      | 4        | 10    | 100     |
| 11                      | 4     | 0          | 1      | 0        | 5     | 55      |
| 12                      | 13    | 1          | 0      | 1        | 15    | 180     |
| 13                      | 2     | 1          | 0      | 2        | 5     | 65      |
|                         | 87    | 9          | 11     | 23       | 130   | 983     |
| $\bar{X}$               | 7.2   | 7.8        | 7.6    | 7.8      |       |         |
| $\bar{X}$ de horas: 7.5 |       |            |        |          |       |         |

Tiempo empleado en AMS UID-3 en obtener resultados (recuento de colonias e identificación de microorganismos) partiendo directamente de la muestra de orina. Las muestras están clasificadas en cuatro grupos según los microorganismos encontrados: 1) Bacilos Gram (-); 2) Cocos Gram (+) 3) levaduras y 4) Muestras polimicrobianas.

En las Tablas 10 a 16, se reflejan los resultados obtenidos por UID-3 AMS con orinas preparadas con cepas ATCC, utilizando una bacteria por muestra y haciendo una suspensión al 0.5 de MacFarland y diluciones al 1/10 (5 diluciones), con objeto de ver el comportamiento de la técnica a / distintas concentraciones de microorganismos y especialmente en aquellas concentraciones donde se encuentran los recuentos de colonias límites para documentar microbiológicamente una infección urinaria.

Se utilizan 12 cepas ATCC, tres de las cuales (Y. enterocolítica, A. calcoaceticus y S. typhimurium) no son / identificables por UID-3 AMS. Estas cepas se utilizaron con el fin de conocer qué tipo de resultados se obtenían con / ellas: si el resultado era "organismo no identificado" o eran identificadas como otra bacteria.

Se prepararon seis suspensiones de cada bacteria a / distintas concentraciones y se realizaron un total de 90 / pruebas ya que se repitieron las 4 diluciones más bajas.

En la Tabla 10, se exponen los resultados correctos o incorrectos obtenidos de los recuentos de colonias, y en la Tabla 11, se detalla el error producido en el recuento, la bacteria que se encontraba en la muestra y la dilución en que se ha producido el error.

TABLA 10.- Resultados de los recuentos de colonias obtenidos con UID-3 AMS con orinas preparadas (una bacteria por muestra)

| UID-3 AMS<br>(recuento colonias) | Método de Referencia |    |
|----------------------------------|----------------------|----|
|                                  | POSITIVO             | %  |
|                                  | Positivo             | 78 |
| Negativo                         | 12                   | 14 |
|                                  | <u>90</u>            |    |

TABLA 11.- Errores en los recuentos de colonias obtenidos con UID-3 AMS con orinas preparadas con cepas ATCC (una bacteria por muestra), comparándolos con el Método de Referencia.

| Recuentos de colonias |              | Bacteria              | Dilución |
|-----------------------|--------------|-----------------------|----------|
| Método de Referencia  | UID-3 AMS    |                       |          |
| más de 50000          | 1000 a 50000 | <u>S.marcescens</u>   | 3        |
| más de 50000          | 1000 a 50000 | <u>P.vulgaris</u>     | 3        |
| más de 50000          | 1000 a 50000 | <u>C.freundii</u>     | 3        |
| 1000 a 50000          | más de 50000 | <u>P.aeruginosa</u>   | 4        |
| 1000 a 50000          | más de 50000 | <u>E.cloacae</u>      | 4        |
| 1000 a 50000          | más de 50000 | <u>S.marcescens</u>   | 4        |
| 1000 a 50000          | más de 50000 | <u>S.aureus</u>       | 5        |
| 1000 a 50000          | más de 50000 | <u>P.vulgaris</u>     | 4        |
| 1000 a 50000          | más de 50000 | <u>C.freundii</u> (2) | 4 y 5    |
| 1000 a 50000          | más de 50000 | <u>E.coli</u>         | 5        |
| negativo              | más de 50000 | <u>P.aeruginosa</u>   | 5        |

En las Tablas 12 y 13, se muestran los resultados de las identificaciones y los microorganismos en que se han producido errores.

En La Tabla 14, se observa un resumen de los errores producidos en los recuentos de colonias e identificacioones con UID-3 AMS, distribuídos por diluciones.

TABLA 12.- Resultados de las identificaciones obtenidas con UID-3 AMS con orinas preparadas con cepas ATCC - (una bacteria por muestra), comparada con el Método de Referencia.

| UID-3 AMS<br>(identificación) | Método de Referencia |      |
|-------------------------------|----------------------|------|
|                               | POSITIVOS            | %    |
| Positivos                     | 76                   | 84.4 |
| Negativos                     | 14                   | 15.6 |
|                               | <u>90</u>            |      |

TABLA 13.- Microorganismos en que se han producido identificaciones incorrectas con UID-3 AMS.

| Identificaciones incorrectas |    |    | Resultado                |
|------------------------------|----|----|--------------------------|
| Microorganismo               | nº | %  |                          |
| <u>E.cloacae</u>             | 2  | 20 | No identificado          |
| <u>S.marcescens</u>          | 1  | 10 | No identificado          |
| <u>C.freundii</u>            | 5  | 60 | No identificado          |
| <u>C.freundii</u>            | 1  |    | Identificado como E.coli |
| <u>S.faecalis</u>            | 3  | 30 | No identificado          |
| <u>C.albicans</u>            | 2  | 20 | No identificado          |

TABLA 14.- Errores en el recuento de colonias y en la identificación obtenidos con UID-3 AMS en orinas preparadas con cepas -/ ATCC (una bacteria por muestra), distribuídos por diluciones.

| Dilución   | nº muestras | Rtº incorrectos | Identif. incorrectas |
|------------|-------------|-----------------|----------------------|
| $10^8$     | 9           | 0               | 2 (22 %)             |
| 1 - $10^7$ | 9           | 0               | 1 (11 %)             |
| 2 - $10^6$ | 18          | 0               | 1 (5.5%)             |
| 3 - $10^5$ | 18          | 3 (16 %)        | 1 (5.5%)             |
| 4 - $10^4$ | 18          | 5 (27 %)        | 4 (22 %)             |
| 5 - $10^3$ | 18          | 4 (22 %)        | 5 (27 %)             |

En las Tablas 15 y 16 se muestran el tiempo en -/ horas que se ha necesitado para obtener resultados (recuento de colonias e identificación) y el tiempo medio que se ha necesitado en las distintas diluciones.

Los resultados obtenidos con las orinas preparadas / con las cepas ATCC que el UID-3 AMS no es capaz de identificar, se exponen en la Tabla 17.

TABLA 15.- Tiempo que tarda en obtenerse resultados de las muestras empleadas con UID-3 AMS

| HORAS | nº MUESTRAS | TOTAL HORAS        |
|-------|-------------|--------------------|
| 3     | 6           | 18                 |
| 4     | 6           | 24                 |
| 5     | 9           | 45                 |
| 6     | 7           | 42                 |
| 7     | 10          | 70                 |
| 8     | 12          | 96                 |
| 9     | 8           | 72                 |
| 10    | 8           | 80                 |
| 11    | 6           | 66                 |
| 12    | 6           | 72                 |
| 13    | 12          | 156                |
|       | 90          | 741:90 = 8.2 horas |

TABLA 16.- Promedio de tiempo que se necesita para obtener resultados con UID-3 AMS clasificados según las diluciones empleadas.

| Dilución   | Media de horas en que se obtiene resultados |
|------------|---|
| $10^8$     | 4.4   |
| $1 - 10^7$ | 5.7   |
| $2 - 10^6$ | 5.8   |
| $3 - 10^5$ | 8.6   |
| $4 - 10^4$ | 9.9   |
| $5 - 10^3$ | 10.8  |

TABLA 17.- Resultados obtenidos con UID-3 AMS con bacterias no identificables con este sistema

|                                    | No identif. | No crecimiento | Identif.incorrecta  |
|------------------------------------|-------------|----------------|---------------------|
| <u>Yersinia enterocolitica</u>     | 6           | -              | -                   |
| <u>Acinetobacter calcoaceticus</u> | 2           | 4              | -                   |
| <u>Salmonella Typhimurium</u>      | 3           | -              | 3 ( <u>E.coli</u> ) |

Igualmente, se han preparado orinas con cepas ATCC de forma que cada muestra tenga dos bacterias. Se efectuaron diluciones de la misma forma que en las suspensiones preparadas con un microorganismo.

Se prepararon cuatro suspensiones diferentes que contenían dos bacterias cada una y se realizaron 60 pruebas ya que las diluciones inferiores al contener las concentraciones críticas para el recuento de colonias, se repitieron / tres veces cada una.

En las Tablas 18, 19 y 20 exponemos las diluciones practicadas y el número de muestras; las suspensiones de / dos bacterias que se han ensayado y las muestras en las que se han identificado las dos bacterias correctamente, aquellas en que sólo se ha identificado adecuadamente una bacteria - y en las que no se ha identificado ninguna bacteria.

TABLA 18.- Orinas preparadas; suspensión de dos bacterias.  
Número de pruebas efectuadas de cada dilución.

| Dilución   | nº de Pruebas |
|------------|---------------|
| $10^8$     | 4 (1 x 4)     |
| 1 - $10^7$ | 4 (1 x 4)     |
| 2 - $10^6$ | 4 (1 x 4)     |
| 3 - $10^5$ | 16 (4 x 4)    |
| 4 - $10^4$ | 16 (4 x 4)    |
| 5 - $10^3$ | 16 (4 x 4)    |

TABLA 19.- Suspensiones de dos bacterias utilizadas

|  |
|--|
| 1 - <u>E. coli</u> - <u>Citrobacter freundii</u> |
| 2 - <u>E. cloacae</u> - <u>S. marcescens.</u>    |
| 3 - <u>P. vulgaris</u> - <u>P. aeruginosa</u>    |
| 4 - <u>S. aureus</u> - <u>S. faecalis</u>        |

TABLA 20.- Orinas preparadas (dos bacterias por muestra).  
Resultados de la identificación.

IDENTIFICACION

---

|  |            |
|--|------------|
| Identificación correcta de las dos bacterias | 36 (60 %)  |
| Identificación correcta de una bacteria      | 17 (28.5%) |
| No identifica ninguna de las dos bacterias   | 7 (11.5%)  |

---

En la Tabla 21, se detallan los errores de identificación clasificados según la suspensión en que se ha producido y en la Tabla 22 los errores de identificación clasificados por diluciones.

TABLA 21.- Orinas preparadas (dos bacterias por suspensión). Resultados de la identificación por UID-3 AMS.

|                                | Identif.2 bacterias | Identif.1 bacteria | No identif. |
|--------------------------------|---------------------|--------------------|-------------|
| <u>E.coli-C.freundii</u>       | 1                   | 10                 | 0           |
| <u>E.cloacae-S.marcescens</u>  | 15                  | 0                  | 0           |
| <u>P.vulgaris-P.aeruginosa</u> | 10                  | 4                  | 1           |
| <u>S.aureus-S.faecalis</u>     | 6                   | 3                  | 6           |

---

TABLA 22.- Orinas preparadas (dos bacterias por suspensión).  
Errores de identificación distribuídos por diluciones.

| Dilución   | Errores de identificación | (%) |
|------------|---------------------------|-----|
| $10^8$     | 0                         | -   |
| 1 - $10^7$ | 0                         | -   |
| 2 - $10^6$ | 1                         | 25  |
| 3 - $10^5$ | 4                         | 25  |
| 4 - $10^4$ | 8                         | 50  |
| 5 - $10^3$ | 11                        | 68  |

Las Tablas 23 y 24 nos muestran el tiempo empleado - para obtener los resultados y el tiempo medio que se ha empleado para cada dilución.

TABLA 23.- Tiempo necesario para obtener resultados con UID-3 AMS en muestras que contenían dos tipos de bacterias distintos.

| HORAS | nº DE MUESTRAS |
|-------|----------------|
| 3     | -              |
| 4     | 1              |
| 5     | 3              |
| 6     | 2              |
| 7     | -              |
| 8     | 3              |
| 9     | 9              |
| 10    | 7              |
| 11    | 12             |
| 12    | 9              |
| 13    | 14             |
|       | <u>60</u>      |

Tiempo medio de identificación: 10.4 horas

TABLA 24.- Tiempo medio de identificación de bacterias con UID-3 AMS distribuído por diluciones

| Dilución   | Tiempo medio |
|------------|--------------|
| $10^8$     | 6.5 horas    |
| 1 - $10^7$ | 6.2 horas    |
| 2 - $10^6$ | 9.7 horas    |
| 3 - $10^5$ | 10.0 horas   |
| 4 - $10^4$ | 11.1 horas   |
| 5 - $10^3$ | 12.4 horas   |

En las Tablas 25, 26 y 27, se obtienen los resultados globales de las orinas preparadas con una y con dos bacterias por muestra, en lo que respecta a: identificaciones correctas, identificaciones correctas repartidas por diluciones y número de horas en que se produjeron los resultados.

TABLA 25.- Resultados de la identificación con UID-3 AMS con orinas preparadas con cepas ATCC con una y dos bacterias por muestra.

| Vitek Urine-3<br>(identificación) | Método de Referencia |      |
|-----------------------------------|----------------------|------|
|                                   | POSITIVOS            | %    |
| Positivos                         | 112                  | 74.6 |
| Negativos                         | 38                   | 25.4 |
|                                   | 150                  |      |

TABLA 26.- Identificaciones incorrectas de suspensiones de una y dos bacterias distribuidas por diluciones.

| Dilución   | nº muestras | Identif. incorrectas |
|------------|-------------|----------------------|
| $10^8$     | 13          | 2 (15 %)             |
| 1 - $10^7$ | 13          | 1 (7.6%)             |
| 2 - $10^6$ | 34          | 2 (9 % )             |
| 3 - $10^5$ | 34          | 5 (14.7%)            |
| 4 - $10^4$ | 34          | 12 (35 %)            |
| 5 - $10^3$ | 34          | 16 (47 %)            |

TABLA 27.- Tiempo en que se ha obtenido resultados con UID-3 AMS con orinas preparadas con una y dos bacterias por muestra.

| HORAS | Nº DE MUESTRAS | TOTAL HORAS                 |
|-------|----------------|-----------------------------|
| 3     | 6              | 18                          |
| 4     | 7              | 28                          |
| 5     | 12             | 60                          |
| 6     | 9              | 54                          |
| 7     | 10             | 70                          |
| 8     | 15             | 120                         |
| 9     | 17             | 153                         |
| 10    | 15             | 150                         |
| 11    | 18             | 198                         |
| 12    | 15             | 180                         |
| 13    | 26             | 338                         |
|       | <u>150</u>     | <u>1369:150 = 9.1 horas</u> |

De 84 hemocultivos crecidos, procedentes de enfermos de nuestro Hospital, a los que se practicó una técnica rápida (AMS) para obtener la identificación y sensibilidad - partiendo directamente del frasco de hemocultivo, se obtuvieron 61 identificaciones correctas, 2 identificaciones - incorrectas y en 21 casos, no se obtuvo identificación.

Estos resultados se encuentran en las Tablas 28, 29 y 30.

TABLA 28.- Bacterias procedentes de hemocultivos, en que se ha conseguido una identificación correcta con una técnica directa utilizando AMS.

| <u>IDENTIFICACIONES CORRECTAS</u> |             |
|-----------------------------------|-------------|
| <u>E. coli</u>                    | 23          |
| <u>P. mirabilis</u>               | 9           |
| <u>S. marcescens</u>              | 6           |
| <u>E. cloacae</u>                 | 6           |
| <u>K. pneumoniae</u>              | 4           |
| <u>E. aerogenes</u>               | 3           |
| <u>Salmonella sp</u>              | 3           |
| <u>C. freundii</u>                | 1           |
| <u>A. lwoffii</u>                 | 1           |
| <u>A. anitratus</u>               | 1           |
| <u>P. aeruginosa</u>              | 4           |
| <hr/>                             |             |
| TOTAL                             | 61 (72.6 %) |

TABLA 29.- Bacterias procedentes de hemocultivos en que se ha producido una identificación incorrecta con una técnica directa utilizando AMS.

IDENTIFICACIONES INCORRECTAS

|                             |                                  |           |
|-----------------------------|----------------------------------|-----------|
| <u>Enterobacter cloacae</u> | como <u>Klebsiella ozenae</u>    | 1         |
| <u>E. coli</u>              | como <u>Citrobacter freundii</u> | 1         |
|                             | TOTAL                            | 2 (2.4 %) |

TABLA 30.- Bacterias procedentes de hemocultivos no identificadas utilizando una técnica directa y AMS

NO IDENTIFICADAS

|                      |           |
|----------------------|-----------|
| <u>S. marcescens</u> | 6         |
| <u>E. coli</u>       | 4         |
| <u>P. aeruginosa</u> | 4         |
| <u>P. mirabilis</u>  | 3         |
| <u>C. freundii</u>   | 1         |
| <u>K. pneumoniae</u> | 1         |
| <u>E. cloacae</u>    | 1         |
| <u>Salmonella sp</u> | 1         |
| TOTAL                | 21 (25 %) |

Se han obtenido pruebas de sensibilidad a 11 antimicrobianos en 75 de los 84 hemocultivos.

Como método de referencia de las pruebas de sensibilidad hemos utilizado los antibiogramas obtenidos con GNS(AMS)

a partir de las colonias crecidas de los pases de hemocultivo a agar sangre.

Como control de calidad de GNS (AMS), se ha utilizado la cepa de E. coli ATCC 25922.

En total se han realizado 825 pruebas de sensibilidad. Los porcentajes de resultados correctos (admitiendo / una desviación de una dilución por encima o por debajo), los antimicrobianos en los que se produjeron errores con desviación de más de una dilución, y la relación de resultados incorrectos obtenidos con la técnica directa comparándolos con el método de referencia, se exponen en las Tablas 31, 32 y 33.

TABLA 31.- Resultados de las pruebas de sensibilidad obtenidos con técnica directa (AMS) comparándolo con el Método de Referencia

|           | Método de Referencia |      |
|-----------|----------------------|------|
|           | POSITIVO             | %    |
| GNS (AMS) |                      |      |
| Positivo  | 780                  | 94.6 |
| Negativo  | 45                   | 5.4  |
|           | <u>825</u>           |      |

TABLA 32.- Antimicrobianos en los que se ha producido error con desviación con más de una dilución en las pruebas de sensibilidad con GNS (AMS)

| ANTIMICROBIANO | nº de veces |
|----------------|-------------|
| Ampicilina     | 2           |
| Carbenicilina  | 5           |
| Gentamicina    | 3           |
| Tobramicina    | 3           |
| Amicacina      | 2           |
| Cefalotina     | 4           |
| Cefamandol     | 10          |
| Cefoxitina     | 7           |
| Trimeth-sulfa  | 2           |
| Cloranfenicol  | 4           |
| Tetraciclina   | 3           |
| TOTAL          | 45 (5.4 %)  |

TABLA 33.- Resultados erróneos con desviación de más de una dilución obtenidos con la técnica directa comparándolos en términos de sensibilidad o resistencia con el método de referencia

| AMS GNS directo | M. referencia | nº |
|-----------------|---------------|----|
| Sensible        | Resistente    | 9  |
| Sensible        | Sensible      | 23 |
| Resistente      | Sensible      | 13 |
| Resistente      | Resistente    | 0  |

En la Tabla 34, encontramos el tiempo en horas en -/ que se obtuvieron resultados de identificación y sensibilidad.

TABLA 34.- Tiempo en que se han obtenido datos sobre identificación y pruebas de sensibilidad en hemocultivos directos con el sistema AMS (GNI,GNS)

| HORAS     | TIEMPO IDENTIFICACION | TIEMPO SENSIBILIDAD |
|-----------|-----------------------|---------------------|
| 3         | -                     | -                   |
| 4         | 21                    | 6                   |
| 5         | 6                     | 8                   |
| 6         | 9                     | 52                  |
| 7         | 4                     | 5                   |
| 8         | 2                     | 2                   |
| 9         | 9                     | 2                   |
| 10        | -                     | -                   |
| 11        | -                     | -                   |
| 12        | -                     | -                   |
| 13        | 8                     | -                   |
| 14        | -                     | -                   |
| 15        | 1                     | -                   |
| 16        | -                     | -                   |
| 17        | 1                     | -                   |
| $\bar{X}$ | 6.9 horas             | 6 horas             |

En 75 ocasiones se obtuvieron pruebas de sensibilidad (89 %)

También hemos utilizado la técnica directa a partir del frasco de hemocultivo, con hemocultivos inoculados -/ por nosotros con cepas ATCC utilizando una cepa por frasco de hemocultivos.

Los resultados obtenidos, las bacterias identificadas correctamente, incorrectamente y no identificadas, así como el tiempo empleado en la identificación y pruebas de sensibilidad, se encuentran en los cuadros, 35, 36 y 37.

TABLA 35.- Resultados obtenidos sobre identificación en hemocultivos directos preparados con cepas / ATCC utilizando el sistema AMS.

|                              |          |
|------------------------------|----------|
| IDENTIFICACIONES INCORRECTAS | 1 (6 %)  |
| IDENTIFICACIONES CORRECTAS   | 14 (87%) |
| NO IDENTIFICADAS             | 1 (6 %)  |
|                              | <hr/>    |
| TOTAL                        | 16       |

---

TABLA 36.- Bacterias procedentes de hemocultivos inoculados con cepas ATCC identificadas correctamente, incorrectamente y no -/ identificadas mediante técnica directa utilizando AMS(GNI)

IDENTIFICACIONES CORRECTAS:

|                         |   |
|-------------------------|---|
| - <u>S. typhimurium</u> | 1 |
| - <u>S. marcescens</u>  | 1 |
| - <u>E. cloacae</u>     | 3 |
| - <u>E. coli</u>        | 1 |
| - <u>K. pneumoniae</u>  | 2 |
| - <u>P. vulgaris</u>    | 1 |
| - <u>P. aeruginosa</u>  | 1 |
| - <u>E. aerogenes</u>   | 1 |
| - <u>A. anitratus</u>   | 1 |
| - <u>S. flexneri</u>    | 1 |
| - <u>C. freundii</u>    | 1 |

IDENTIFICACIONES INCORRECTAS:

|  |   |
|--|---|
| - <u>Shigella sonnei</u> como <u>Salmonella sp</u> | 1 |
|--|---|

NO IDENTIFICADAS:

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| - <u>Yersinia enterocolitica</u> | 1 |
|----------------------------------|---|

TABLA 37.- Tiempo que se ha necesitado para obtener datos sobre identificación y sensibilidad con un método directo (AMS) en hemocultivos inoculados con cepas ATCC.

| CEPAS ATCC               | TIEMPO IDENTIFICACION | TIEMPO SENSIBILIDAD |
|--------------------------|-----------------------|---------------------|
| <u>S. typhimurium</u>    | 6                     | 6                   |
| <u>S. marcescens</u>     | 13                    | 7                   |
| <u>E. cloacae</u>        | 8                     | 7                   |
| <u>E. cloacae</u>        | 7                     | 7                   |
| <u>E. coli</u>           | 4                     | 6                   |
| <u>K. pneumoniae</u>     | 4                     | 5                   |
| <u>K. pneumoniae</u>     | 4                     | 5                   |
| <u>P. vulgaris</u>       | 6                     | -                   |
| <u>Ps. aeruginosa</u>    | 18                    | 8                   |
| <u>E. aerogenes</u>      | 4                     | 4                   |
| <u>A. anitratus</u>      | 7                     | 9                   |
| <u>S. sonnei</u>         | 13                    | 10                  |
| <u>S. flexneri</u>       | 6                     | 6                   |
| <u>C. freundii</u>       | 4                     | 6                   |
| <u>Y. enterocolitica</u> | -                     | 9                   |
| $\bar{X}$ HORAS          | 7.3                   | 6.6                 |

EXUDADO DE PETEQUIA

En 95 enfermos con sospecha de sepsis meningocócica, se practicó el examen del exudado de petequia teñido con el método de Gram, como técnica diagnóstica rápida.

En 67 enfermos se confirmó clínicamente el diagnóstico de sepsis meningocócica y 28 fueron diagnosticados -/ más adelante de otros procesos.

TABLA 38.- Sepsis meningocócicas confirmadas clínicamente

NUMERO DE ENFERMOS ESTUDIADOS: 95

RESULTADOS CLINICOS

|                      |    |
|----------------------|----|
| Sepsis meningocócica | 67 |
| Otros procesos       | 28 |

TABLA 39.- Casos en que el exudado de petequia y el hemocultivo fueron positivos en enfermos con diagnóstico positivo de sepsis meningocócica y en enfermos diagnosticados de otros procesos.

|                      | TOTAL | PETEQUIAS (+) | HEMOCULTIVOS (+) |
|----------------------|-------|---------------|------------------|
| Sepsis meningocócica | 67    | 48<br>71.6 %  | 16<br>23.8 %     |
| Otros procesos       | 28    | 2<br>7.1 %    | 0<br>0 %         |

TABLA 40.- Casos en que los resultados del exudado de petequia y el hemocultivo han coincidido o han discrepado en enfermos con diagnóstico de sepsis meningocócica

|                                |    |
|--------------------------------|----|
| Petequia (+) - Hemocultivo (+) | 15 |
| Petequia (+) - Hemocultivo (-) | 33 |
| Petequia (-) - Hemocultivo (+) | 1  |
| Petequia (-) - Hemocultivo (-) | 18 |
|                                | 67 |
| TOTAL                          | 67 |

En las Tablas 41 y 42, se encuentran la sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo y negativo obtenidos con los exudados de petequia y hemocultivos tomando como referencia la confirmación clínica, analítica y evolutiva del diagnóstico de sepsis meningocócica.

TABLA 41.- Sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo del exudado de petequia en el diagnóstico de sepsis meningocócica

|              | REFERENCIA |          |    |
|--------------|------------|----------|----|
|              | POSITIVO   | NEGATIVO |    |
| Ex. Petequia | Positivo   | 48       | 2  |
|              | Negativo   | 19       | 26 |
|              |            | 67       | 28 |

Sensibilidad: 71.6 %; Especificidad: 92.8 %; Valor predictivo positivo: 96 %; Valor predictivo negativo: 57 %

TABLA 42.- Sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo obtenidos en el hemocultivo en una serie de 95 enfermos con diagnóstico previo de sepsis meningocócica.

|             |          | REFERENCIA |          |
|-------------|----------|------------|----------|
|             |          | POSITIVO   | NEGATIVO |
| Hemocultivo | Positivo | 16         | 0        |
|             | Negativo | 51         | 28       |
|             |          | 67         | 28       |

Sensibilidad: 23.8 %; Especificidad: 100 %; Valor predictivo positivo: 100 %; Valor predictivo negativo: 35 %.

Se han estudiado 1230 frascos de hemocultivo con el sistema Bactec NR-660, detectándose crecimiento en 179 frascos (14.5%) . En 164 de ellos se aislaron bacterias en los subcultivos considerándose el resto negativos.

En la Tabla 43, se expone la sensibilidad y especificidad de la prueba.

TABLA 43.- Sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo obtenidos con Bactec NR-660 / en 1230 botellas de hemocultivo

|        |          | REFERENCIA |          |
|--------|----------|------------|----------|
|        |          | POSITIVO   | NEGATIVO |
| Bactec | Positivo | 164        | 15       |
|        | Negativo | 0          | 1051     |
|        |          | 164        | 1066     |

Sensibilidad: 100 %; Especificidad: 98 %; Valor predictivo positivo: 91 %; Valor predictivo negativo: 100 %.

En la Tabla 44, observamos los falsos positivos clasificados según el umbral de lectura de CO<sub>2</sub>

TABLA 44.- Relación de resultados positivos y falsos positivos clasificados según el umbral de lectura de CO<sub>2</sub>

| LECTURAS DE CO <sub>2</sub> | nº  | POSITIVO | FALSOS POSITIVOS |
|-----------------------------|-----|----------|------------------|
| 35                          | 2   | 2        | 0                |
| 35-40                       | 20  | 6        | 14               |
| 41-50                       | 8   | 7        | 1                |
| 50                          | 149 | 149      | 0                |

En las Tablas 45 y 46, exponemos los días en que - detectó el crecimiento y si fué en frasco aerobio o anaerobio y las bacterias aisladas, señalando también en qué tipo de botella se aislaron.

TABLA 45.- Número de frascos y día en que se detectó crecimiento si fué en frasco aerobio o anaerobio.

| DIAS | AEROBIOS | ANAEROBIOS |
|------|----------|------------|
| 1    | 32       | 30         |
| 2    | 21       | 27         |
| 3    | 19       | 21         |
| 4    | 14       | 5          |
| 5    | 8        | 2          |
|      | 94       | 85         |

TABLA 46.- Relación de bacterias aisladas en frascos aerobios y anaerobios

| MICROORGANISMOS                | F. AEROBIOS | F. ANAEROBIO |
|--------------------------------|-------------|--------------|
| <u>Staphylococcus</u> coag.(-) | 12          | 17           |
| <u>S. Thyphi</u>               | 6           | 4            |
| <u>M. morganii</u>             | 3           | 3            |
| <u>Clostridium</u> sp.         | -           | 1            |
| <u>P. aeruginosa</u>           | 4           | -            |
| <u>Brucella</u> sp.            | 1           | -            |
| <u>P. mirabilis</u>            | 11          | 14           |
| <u>E. coli</u>                 | 24          | 19           |
| <u>Candida albicans</u>        | 1           | -            |
| <u>S. enteritidis</u>          | 2           | -            |
| <u>S. faecium</u>              | -           | 1            |
| <u>P. acnes</u>                | 1           | 8            |
| <u>M. luteus</u>               | 1           | 1            |
| <u>Corynebacterium</u> sp.     | 1           | -            |
| <u>S. aureus</u>               | 7           | 6            |
| <u>B. fragilis</u>             | 1           | 5            |
| <u>S. grupo viridans</u>       | -           | 1            |
| <u>S. faecalis</u>             | 1           | 2            |
| <u>S. pneumoniae</u>           | 3           | 3            |
|                                | 79          | 85           |

TABLA 47.- Estudio de sensibilidad de coaglutinación y aglutinación de látex con S.pneumoniae en Líquido Cefalorraquídeo / (estudio in vitro)

| Dilución del<br>0.5 MacFarland | Rtº. colonias            | Látex<br>(Bactigen) | Coaglutinación<br>(Phadebact CSF) |
|--------------------------------|--------------------------|---------------------|-----------------------------------|
| 1 1/10                         | más de $1.5 \times 10^5$ | +++                 | +                                 |
| 2 1/100                        | 45000                    | ++                  | -                                 |
| 3 1/300                        | 18500                    | ±                   | -                                 |
| 4 1/600                        | 8000                     | -                   | -                                 |
| 5 1/1200                       | 4500                     | -                   | -                                 |
| 6 1/2400                       | 2000                     | -                   | -                                 |
| 7 1/4800                       | 0                        | -                   | -                                 |

TABLA 48.- Estudio de reproductibilidad de coagulación y aglutinación de látex con S. pneumoniae en Líquido Cefalorraquídeo (estudio in vitro)

| Dilución del<br>0.5 MacFarland | Rtº. colonias            | Látex<br>(Bactigen) | Coagulación<br>(Phadebact CSF) |
|--------------------------------|--------------------------|---------------------|--------------------------------|
| 1 1/10                         | más de $1.5 \times 10^5$ | ++                  | +                              |
| 1 1/10                         | más de $1.5 \times 10^5$ | ++                  | +                              |
| 1 1/10                         | más de $1.5 \times 10^5$ | ++                  | +                              |
| 2 1/100                        | 45000                    | +                   | -                              |
| 2 1/100                        | 45000                    | +                   | -                              |
| 2 1/100                        | 45000                    | +                   | -                              |
| 3 1/300                        | 18500                    | -                   | -                              |
| 3 1/300                        | 18500                    | -                   | -                              |
| 3 1/300                        | 18500                    | -                   | -                              |
| 4 1/600                        | 8000                     | -                   | -                              |
| 4 1/600                        | 8000                     | -                   | -                              |
| 4 1/600                        | 8000                     | -                   | -                              |

TABLA 49.- Estudio de sensibilidad de aglutinación en látex y coaglu  
tinación con H. influenzae en Líquido Cefalorraquídeo  
(estudio in vitro)

| Dilución del<br>0.5 MacFarland | Rtº. colonias            | Látex<br>(Bactigen) | Coaglutinación<br>(Phadebact CSF) |
|--------------------------------|--------------------------|---------------------|-----------------------------------|
| 1 1/10                         | más de $1.5 \times 10^5$ | +++                 | +++                               |
| 2 1/100                        | más de $1.5 \times 10^5$ | +++                 | ++                                |
| 3 1/300                        | más de $1.5 \times 10^5$ | +++                 | +                                 |
| 4 1/600                        | 120000                   | ++                  | +                                 |
| 5 1/1200                       | 80000                    | ++                  | -                                 |
| 6 1/2400                       | 50000                    | +                   | -                                 |
| 7 1/4800                       | 40000                    | +                   | -                                 |
| 8 1/9600                       | 15000                    | -                   | -                                 |

TABLA 50.- Estudio de reproductibilidad de aglutinación de látex y coaglutinación con H. influenzae en Líquido Cefalorraquídeo (estudio in vitro)

| Dilución del<br>0.5 MacFarland | Rtº. colonias            | Látex<br>(Bactigen) | Coaglutinación<br>(Phadebact CSF) |
|--------------------------------|--------------------------|---------------------|-----------------------------------|
| 3 1/300                        | más de $1.5 \times 10^5$ |                     | +                                 |
| 3 1/300                        | más de $1.5 \times 10^5$ |                     | +                                 |
| 3 1/300                        | más de $1.5 \times 10^5$ |                     | +                                 |
| 4 1/600                        | 120000                   |                     | +                                 |
| 4 1/600                        | 120000                   |                     | +                                 |
| 4 1/600                        | 120000                   |                     | +                                 |
| 5 1/1200                       | 80000                    | ++                  | -                                 |
| 5 1/1200                       | 80000                    | ++                  | -                                 |
| 5 1/1200                       | 80000                    | ++                  | -                                 |
| 6 1/2400                       | 50000                    | +                   | -                                 |
| 6 1/2400                       | 50000                    | +                   | -                                 |
| 6 1/2400                       | 50000                    | +                   | -                                 |
| 7 1/4800                       | 40000                    | +                   |                                   |
| 7 1/4800                       | 40000                    | +                   |                                   |
| 7 1/4800                       | 40000                    | +                   |                                   |
| 8 1/9600                       | 15000                    | -                   |                                   |
| 8 1/9600                       | 15000                    | -                   |                                   |
| 8 1/9600                       | 15000                    | -                   |                                   |

TABLA 51.- Estudio de sensibilidad de coaglutinación, aglutinación de látex y ELISA con N. meningitidis en Líquido Cefalorraquídeo (estudio in vitro)

| Dilución del<br>0.5 MacFarland | Rtº colonias             | Látex<br>(Bactigen) | ELISA | Coaglutinación<br>(Phadebact CSF) |
|--------------------------------|--------------------------|---------------------|-------|-----------------------------------|
| 1 1/10                         | más de $1.5 \times 10^5$ | +++                 | +++   | +                                 |
| 2 1/100                        | 24000                    | ++                  | +++   | -                                 |
| 3 1/300                        | 11000                    | +                   | ++    | -                                 |
| 4 1/600                        | 9000                     | ±                   | +     | -                                 |
| 5 1/1200                       | 3000                     | -                   | +     | -                                 |
| 6 1/2400                       | 1000                     | -                   | -     | -                                 |

TABLA 52.- Estudio de reproductibilidad de coagulación, aglutinación de látex y ELISA con N. meningitidis en Líquido Cefalorraquídeo (estudio in vitro)

| Dilución del<br>0.5 MacFarland | Rtº. colonias<br>en MH   | Látex<br>(Bactigen) | Coagulación<br>(Phadebact CSF) | ELISA |
|--------------------------------|--------------------------|---------------------|--------------------------------|-------|
| 1 1/10                         | más de $1.5 \times 10^5$ |                     | +                              |       |
| 1 1/10                         | más de $1.5 \times 10^5$ |                     | +                              |       |
| 1 1/10                         | más de $1.5 \times 10^5$ |                     | +                              |       |
| 2 1/100                        | 24000                    |                     | -                              |       |
| 2 1/100                        | 24000                    |                     | -                              |       |
| 2 1/100                        | 24000                    |                     | -                              |       |
| 3 1/300                        | 11000                    | +                   |                                |       |
| 3 1/300                        | 11000                    | +                   |                                |       |
| 3 1/300                        | 11000                    | +                   |                                |       |
| 4 1/600                        | 9000                     | ±                   |                                | +     |
| 4 1/600                        | 9000                     | ±                   |                                | +     |
| 4 1/600                        | 9000                     | ±                   |                                | +     |
| 5 1/1200                       | 3000                     | -                   |                                | +     |
| 5 1/1200                       | 3000                     | -                   |                                | +     |
| 5 1/1200                       | 3000                     | -                   |                                | +     |
| 6 1/2400                       | 1000                     | -                   |                                | -     |
| 6 1/2400                       | 1000                     | -                   |                                | -     |
| 6 1/2400                       | 1000                     | -                   |                                | -     |

En las Tablas 53, 54 y 55, se muestran los resultados obtenidos sobre especificidad de coagulación (Phadebact CSF) aglutinación de látex (Bactigen) y ELISA (Gonozyme).

TABLA 53.- Estudio de especificidad de coagulación (Phadebact CSF) (N. meningitidis, H. influenzae y S. pneumoniae) en Líquido Cefalorraquídeo (estudio in vitro)

|                                  | N.meningitidis | H.influenzae | S . pneumoniae |
|----------------------------------|----------------|--------------|----------------|
| <u>Streptococcus</u> grupo D     | ±              | -            | -              |
| <u>Streptococcus</u> grupo B     | ±              | -            | -              |
| <u>Bordetella bronchiseptica</u> | -              | -            | -              |
| <u>Klebsiella pneumoniae</u>     | -              | -            | -              |
| <u>S. pneumoniae</u>             | -              | -            | +              |
| <u>H. influenzae</u>             | -              | +            | -              |
| <u>N. meningitidis</u>           | +              | -            | -              |

TABLA 54.- Estudio de especificidad de aglutinación de látex (Bactigen) N.meningitidis, H.influenzae, S .pneumoniae en Líquido Cefalorraquídeo (estudio in vitro)

|                                  | N.meningitidis | H.influenzae | Sr.pneumoniae |
|----------------------------------|----------------|--------------|---------------|
| <u>Streptococcus</u> grupo D     | -              | -            | -             |
| <u>Streptococcus</u> grupo B     | -              | -            | -             |
| <u>Bordetella bronchiseptica</u> | -              | -            | -             |
| <u>Klebsiella pneumoniae</u>     | -              | -            | -             |
| <u>S. pneumoniae</u>             | -              | -            | +             |
| <u>H. influenzae</u>             | -              | +            | -             |
| <u>N. meningitidis</u>           | +              | -            | -             |

TABLA 55.- Estudio de especificidad del método ELISA (Gonozyne) (N. meningitidis) en Líquido Cefalorraquídeo (estudio in vitro)

|                                  | N. meningitidis |
|----------------------------------|-----------------|
| <u>Streptococcus</u> grupo D     | -               |
| <u>Streptococcus</u> grupo B     | -               |
| <u>Bordetella bronchiseptica</u> | +               |
| <u>Klebsiella pneumoniae</u>     | -               |
| <u>S. pneumoniae</u>             | -               |
| <u>H. influenzae</u>             | -               |
| <u>N. meningitidis</u>           | +               |
| <u>N. sicca</u>                  | +               |

## V. DISCUSSION

## V.- DISCUSION

### INFECCION URINARIA

El gran número de muestras de orina que llega a los laboratorios de Microbiología Clínica para un examen bacteriológico, ha propiciado la incorporación de técnicas / rápidas de selección de orinas con bacteriuria significativa. Recordemos que los cultivos de orina constituyen -/ aproximadamente una tercera parte de la carga de trabajo de un laboratorio de bacteriología y que de estas mues- tras, menos del 25 % son positivas, entendiendo como posi- tivas las que muestran la existencia de microorganismos - en número significativo de padecer infección urinaria . Además un buen número de septicemias por bacilos Gram ne- gativos tienen su origen en una infección urinaria y en / estas ocasiones un diagnóstico rápido del microorganismo en orina, además de obtenerse mucho más rápidamente que mediante hemocultivo, nos permite conocer el diagnóstico etiológico e instaurar una terapéutica antimicrobiana co- rrecta en un paciente con una infección grave que pone / su vida en peligro.

### ESTERASA LEUCOCITARIA Y REDUCCION DE NITRATOS

Como parece que hay una buena correlación entre la -

bacteriuria y la existencia de 10 o más leucocitos por ml. de orina (81, 171), no es de extrañar que se utilizase el recuento de leucocitos en cámara como técnica rápida y reproductible para el diagnóstico de bacteriuria. Posteriormente aparecieron tiras reactivas que permitían conocer la existencia de leucocituria, midiendo la esterasa leucocitaria que se encuentra en los neutrófilos, ya que la mayoría de los leucocitos que se encuentran en la orina son de esta clase. La técnica de la esterasa leucocitaria aportaba por una parte, mayor rapidez (dos minutos), cuestión estimable cuando existe gran número de muestras, y por otra -/ parte no verse afectada por la lisis leucocitaria que se produce en las orinas alcanzando cierta importancia en el transcurso de pocas horas. Sin embargo, al utilizar sólomente esta prueba para detección de bacteriurias no se obtuvieron resultados totalmente satisfactorios, sobre todo en mujeres (142).

Como la mayoría de las bacterias que producen infección urinaria son capaces de reducir los nitratos a nitritos, se pensó en la utilidad de esta prueba para la selección de orinas con bacteriuria. La prueba de Griess (161) fué también mejorada en cuanto a tiempo y sencillez de / realización, por tiras reactivas, que en un minuto obtienen el resultado de la reacción.

La utilización de esta prueba sola como indicador de la existencia de bacteriuria, ha demostrado en general una baja sensibilidad que variaba según el tipo de tiras reactivas empleado (42, 84, 184), si bien la especificidad es muy alta.

Entonces se empezó a utilizar estas dos pruebas de forma conjunta con lo que se pretendía mejorar la sensibilidad y especificidad de cada una de ellas por separado.

Nosotros hemos utilizado las tiras reactivas Combur 9 test (Boehringer Mannheim) valorando entre los nueve parámetros que ofrece, sólo esterasa leucocitaria y reducción de nitratos a nitritos con el fin de evaluar su utilidad en la detección rápida de bacteriurias significativas.

Con doscientas quince orinas estudiadas, se ha obtenido una sensibilidad del método del 85 %, una especificidad del 76 %, un valor predictivo positivo del 84 % y un valor predictivo negativo del 77 % (Tabla 1).

La sensibilidad obtenida por distintos autores (106, 132, 136, 141, 184) , ha sido muy similar a la nuestra con valores que oscilan entre 74 y 90 % con alguna excepción - como los que encuentran valores tan altos como 100 % (132).

En la especificidad hay una mayor homogeneidad en -/ los resultados, que son desde un 72.6 % (132) a un 85.5 % (141), obteniendo dos autores (106, 136), resultados prácticamente idénticos a los nuestros.

En los valores predictivos positivos, aunque algunos (184) encuentran porcentajes muy parecidos a los nuestros (84.8 %), la mayoría obtienen valores inferiores. Creemos que esto es debido al alto porcentaje de orinas positivas (60 %) en nuestra serie, debido seguramente a que las orinas fueron de alguna forma seleccionadas, eligiendo preferentemente, las de Servicios críticos con un alto índice de infecciones urinarias.

Esta misma razón es la que probablemente influye en que el valor predictivo negativo obtenido por nosotros -/ (77 %) sea bajo en relación a otros que superan el 90 % , aunque algunos obtienen valores tan bajos como 51.3 %(184).

Al dividir las orinas positivas de nuestra serie en tres grupos, según los microorganismos aislados sean: bacilos Gram negativos; cocos Gram positivos y levaduras o -/ flora polimicrobiana, observamos que los porcentajes de - resultados positivos obtenidos con Combur test son idénticos para el primer y tercer grupo (86 %), siendo algo inferior en el grupo de cocos Gram positivos o levaduras (80%)

lo que es normal puesto que la reacción de nitratos ofrece peores resultados con cocos Gram positivos y levaduras (Tabla 5).

Esta prueba tiene dos importantes ventajas que son - la sencillez de realización y su rapidez que es inferior a 2 minutos. Como mayor inconveniente se puede señalar que - no se obtiene ninguna información acerca de los microorganismos en orden a orientar su diagnóstico etiológico.

Su sensibilidad la podemos calcular entre un 85 y / 90 % y su especificidad alrededor del 75 %.

Por lo tanto, esta técnica se muestra como un método útil, sencillo y rápido para el despistaje de infecciones - urinarias, sin embargo, el número de falsos negativos que se obtiene y la frecuencia con que estos se producen en enfermos neutropénicos graves, hacen necesaria la práctica / del cultivo de orina como método confirmativo de los resultados.

Por otra parte es un buen método de selección de orinas para ser examinadas con otro tipo de técnicas rápidas como UID-3 AMS cuyo coste elevado aconseja una selección - previa.

## TINCION DE GRAM Y NARANJA DE ACRIDINA

La tinción de Gram es un técnica que por su rapidez y economía, se ha utilizado desde hace muchos años en el diagnóstico rápido en Microbiología. Aunque en una época / cayó en un cierto desuso, otra vez existe un renovado interés en sacar todo el rendimiento que esta tinción es capaz de ofrecer. Por lo tanto, también se ha aplicado la tin - / ción de Gram al diagnóstico de la infección urinaria. Aunque algunos utilizan la tinción de Gram del sedimento de la orina centrifugada, la tinción de una preparación hecha con una gota de orina sin centrifugar lleva menos tiempo y es más fácil de interpretar, considerando que la existen - cia de dos o más bacterias por campo (examinando la preparación con objetivo de inmersión equivalen a una bacteriuria de al menos  $10^5$  bacterias por ml. de orina) (153).

La utilización de una solución de naranja de acridina a pH bajo para teñir muestras clínicas, con observación al microscopio de fluorescencia, se reveló como una técnica muy interesante, ya que se producía una tinción muy llamativa de las bacterias, en color naranja. Está considerado como más sensible que el Gram en muestras con poca cantidad de bacterias.

Nosotros hemos utilizado los dos tipos de tinciones

en doscientas quince muestras de orinas procedentes de enfermos con sospecha de infección urinaria para evaluar su utilidad como técnica rápida de diagnóstico en estas infecciones. Las tinciones se realizaron en preparaciones hechas con orina sin centrifugar y se consideraron positivas si se observaban una o más bacterias por campo con objetivo de inmersión.

En la tinción de Gram, hemos encontrado una sensibilidad del 94 %, una especificidad de 95 %, un valor predictivo positivo de 96 % y un valor predictivo negativo de -/92 % (Tabla 2).

Entre varios autores consultados (62, 106, 107, 142, 179, 184, 198), la sensibilidad es alta, por encima del -/90 % para muchos, con alguna excepción (142) que en un estudio en mujeres encontró una sensibilidad del 77 %. La especificidad es alta pues salvo una especificidad del 77.6% (184), el resto la situa por encima del 90 %.

También el valor predictivo negativo se situa en esta ocasión sin excepciones por encima del 90 % con valores entre 92 y 99.7 %. En el valor predictivo positivo es donde se encuentran datos tan dispares como 47.7 %, 53.5 %, /66.7 %, 71 %, 81 % y 93 %.

Con la tinción de naranja de acridina hemos obtenido una sensibilidad de 95 %, una especificidad del 89 %, un valor predictivo positivo de 93 % y un valor predictivo negativo de 92 % (Tabla 3).

Existen abundantes estudios de la utilización de naranja de acridina en diversas muestras clínicas como líquido cefalorraquídeo o hemocultivos (98, 105, 123), pero no en infecciones urinarias.

Sin embargo, como es una técnica que se basa en una tinción, la podemos comparar perfectamente con los resultados que se obtienen con la tinción de Gram. En nuestra serie, los resultados obtenidos con la tinción de Gram y la de naranja de acridina, son muy similares con una ligera mayor sensibilidad a favor de la tinción con naranja de acridina y una mayor especificidad para la tinción de Gram.

Si separamos las orinas positivas en tres grupos según el microorganismo encontrado: a) bacilos Gram negativos, b) cocos Gram positivos y levaduras y c) flora polimicrobiana, los porcentajes de resultados positivos conseguidos tanto con una tinción como con otra, son prácticamente iguales en los tres grupos (Tablas 6 y 7).

En consecuencia la tinción de Gram de una gota de orini

na sin centrifugar es una técnica sencilla, poco costosa, con una sensibilidad y especificidad muy alta, que puede considerarse como una prueba de elección para la detección rápida de bacteriurias significativas. Además proporciona datos sobre la morfología de las bacterias, su agrupación y gram positividad o gram negatividad, que permiten un acercamiento al diagnóstico etiológico. Sin embargo, hay que realizar a la vez un cultivo de orina para confirmar los resultados y conseguir la identificación y pruebas de sensibilidad de los microorganismos.

Aunque la tinción con naranja de acridina se ha considerado más sensible que la de Gram, en nuestra serie se obtienen resultados similares, no encontrando ventajas en la tinción de naranja de acridina, a no ser el gusto del observador o la mayor comodidad y menor cansancio del microscopista, al poder observar las preparaciones con objetivo seco de bajo aumento.

Uno de los inconvenientes que encontramos con estas técnicas microscópicas es la carga de trabajo que supone en laboratorios con muchas muestras de orina.

#### AUTOMICROBIC SYSTEM COMO METODO RAPIDO DE DIAGNOSTICO DE INFECCION URINARIA

Entre los sistemas automáticos que han aparecido en

los últimos años, capaces de detectar bacteriurias significativas, llama la atención Automicrobic System, debido a - que es un sistema automático que es capaz de detectar, hacer un recuento de colonias e identificar las bacterias y levaduras que se encuentran en las muestras de orina. La base biológica de este sistema, reside en medios liofilizados / específicos, altamente selectivos situados en pocillos en tarjetas de plástico desechables. Al introducir la muestra, rehidrata e inocula los medios existentes en los pocillos. Mediante un sistema óptico automático, y un computador, detectan los cambios en los medios de cultivo, ofreciendo resultados sobre recuento de colonias e identificación de -/ una forma automática en un tiempo inferior a 13 horas (4). Las tarjetas desechables que en un principio se utilizaban una por muestra, posteriormente han sido adaptadas, con el mismo principio biológico, para analizar tres muestras por tarjeta (UID-3).

Hemos utilizado Automicrobic System con las tarjetas UID-3 en doscientas quince orinas procedentes de enfermos para valorar su utilidad en el diagnóstico rápido de bacteriurias significativas. Se han valorado, por un lado el recuento de colonias y por otro la identificación de los microorganismos.

En el recuento de colonias se ha obtenido una sensi-

bilidad igual a la especificidad, 97 %, un valor predictivo positivo de 98 % y un valor predictivo negativo de 96 % (Tabla 4).

En las identificaciones se han obtenido un 92.3 % de resultados concordantes con el método de referencia.

Distribuyendo las muestras positivas en tres grupos - según los microorganismos que se encontraron en ellas: a) bacilos Gram negativos, b) cocos Gram positivos y levaduras y c) muestras polimicrobianas, las identificaciones correctas con UID-3 fueron el 93 %, 100 % y 82 % respectivamente. El tiempo medio empleado en la identificación de estos grupos fué prácticamente igual, oscilando entre 7.2 y 7.8 horas con una media para todos ellos de 7.5 horas (Tablas 8 y 9).

Nuestros resultados son coincidentes con una evaluación hecha bajo los auspicios del Colegio Americano de Patólogos en el que encuentran una correlación con los métodos clásicos del 99 % para el recuento de colonias (excepto para levaduras) y del 95 % para la identificación (128). Otros autores, con orinas procedentes de muestras clínicas y orinas simuladas, obtienen resultados parecidos, con valores por encima del 90 % (4, 83, 168). Hay autores, que obtienen resultados inferiores, detectando el 82.8 % del -

total de las orinas positivas. No obstante, este porcentaje sube al 95.8 %, si no se valoran las posibles contaminaciones (143).

También se hizo un estudio con orinas preparadas con cepas ATCC. Este estudio constaba de dos partes. En la primera, se utilizaron orinas preparadas con una cepa por muestra (90 muestras en total); en la segunda, se prepararon las orinas con dos bacterias por muestra (60 muestras).

En las dos series se utilizó la misma sistemática: se hacia con cada bacteria o mezcla de bacterias, una suspensión al 0.5 de MacFarland y a partir de ella, cinco diluciones seriadas al 1/10 en orina estéril, de forma que se obtenían seis orinas simuladas con concentraciones distintas de microorganismos, desde  $10^8$  a  $10^3$ , por cada cepa ATCC utilizada individualmente o por cada mezcla de dos bacterias. En las orinas preparadas con una bacteria, se repitieron las cuatro diluciones más bajas una vez y en las preparadas con dos bacterias se repitieron las tres diluciones más bajas / tres veces cada una (Tabla 18).

Con la orinas simuladas que contenian sólo una bacteria, obtuvimos los siguientes resultados: el recuento de colonias fué correcto en el 86 % de las muestras (Tabla 10). Este dato es bastante más bajo que el 97 % obtenido con -/

muestras clínicas. Si distribuimos estos errores por diluciones (Tabla 11), advertimos que se producen todos en las diluciones que contienen menor cantidad de bacterias  $10^3$ ,  $10^4$  y  $10^5$  es decir, en las diluciones que podríamos calificar de críticas para diagnosticar una infección urinaria.

Las identificaciones correctas se produjeron en un / 84.4 % (Tabla 12), también inferior al 92.3 % obtenido con muestras clínicas. Los microorganismos no identificados -/ fueron: E. cloacae, S. marcescens, C. freundii, S. faecalis y C. albicans y llama la atención C. freundii que en el 60 % de las veces que fué probado no se identificó o -/ fué identificado incorrectamente (Tabla 13). Los errores de identificación se produjeron en todas las diluciones, pero se advierte un mayor número de errores en las diluciones / más bajas (Tabla 14) (en las diluciones más bajas se producen las 2/3 partes de los errores).

El tiempo medio necesario para la obtención de resultados fué de 8.2 horas (Tabla 15), observándose claramente cómo cuanto menor es la cantidad de bacterias en la suspensión, mayor es el tiempo en que se obtienen resultados (Tabla 16).

Se emplearon tres bacterias que no son identificables por UID-3 AMS. Para dos de ellas (Y. enterocolítica y A.

calcoaceticus) no se obtuvo crecimiento o no fueron identificadas.

La tercera, S. typhimurium, la mitad de las veces no fué identificada y la otra lo fué como E. coli (Tabla 17).

En las orinas preparadas con dos bacterias se utilizaron cuatro clases de mezclas de bacterias a partes iguales (Tabla 19), utilizando en alguna de ellas, bacterias con -/ las que según algunos autores (4) o por experiencia propia, se obtienen peores resultados (P. aeruginosa, S. aureus, C. freundii). Una identificación correcta de las dos bacterias que se encontraban en las orinas preparadas, se produjo en el 60 % de los casos. Los errores, se produjeron en todas las suspensiones que contenían alguna de las bacterias antes citadas. (Tabla 20 y 21). También se puede apreciar, cómo el porcentaje de errores va aumentando progresivamente según va disminuyendo el número de bacterias en las muestras (Tabla 22). Así en las muestras que contienen  $10^8$  y  $10^7$  bacterias por ml. no se produce ningún error de identificación. Por el contrario, en las orinas que tienen  $10^3$  bacterias por ml. en el 68 % de ellas se producen fallos de identificación.

El tiempo medio de identificación en esta serie fué de 10.4 horas, muy superior a la serie que contenía sólo /

una bacteria. También es necesario más tiempo para la obtención de resultados cuanto menor es la concentración de bacterias (Tabla 23 y 24).

Automicrobic System, es un sistema automatizado, que analizando directamente la orina, proporciona un recuento de colonias global y la identificación de los microorganismos existentes en la muestra.

La realización de la técnica es fácil y el tiempo que necesita para obtener resultados oscila entre 3-13 horas.

Con muestras clínicas se obtienen buenos resultados en un corto espacio de tiempo que en nuestra serie es de / 7.5 horas. Sin embargo, cuando se prueba con muestras que / contienen concentraciones bajas de microorganismos, se producen fallos en los recuentos e identificaciones considerándose los resultados menos satisfactorios con estas muestras (Tablas 25, 26 y 27). También hay que tener en cuenta que en bacteriurias por bacterias no identificables por el sistema, aunque no sean muy frecuentes, pueden existir errores.

Los mayores inconvenientes son, su coste y la necesidad de practicar simultáneamente un cultivo de orina, debido a que este sistema no proporciona la sensibilidad a los antibióticos de los microorganismos, y hay que obtenerla a

partir de las colonias crecidas en el cultivo. También sirve el cultivo como comprobación de la técnica.

### SEPTICEMIA

El diagnóstico microbiológico rápido de la septicemia, es uno de los problemas importantes con los que se encuentra un laboratorio de Microbiología Clínica. La gravedad - de la enfermedad, la amplia gama de microorganismos que la pueden producir y los enfermos comprometidos sobre los que con frecuencia recaen estos procesos (9, 130, 159, 188) son factores que hacen exigir un diagnóstico etiológico acompañado de la sensibilidad a los antibióticos lo más rápido - posible, para que la terapéutica antimicrobiana sea la más correcta.

Una mayor rapidez en el diagnóstico, se puede intentar bien detectando el crecimiento bacteriano en las botellas de hemocultivo con prontitud o bien una vez obtenido el crecimiento, conseguir una rápida identificación y pruebas de sensibilidad del agente etiológico.

IDENTIFICACION Y PRUEBAS DE SENSIBILIDAD DE BACÍLOS -  
GRAM NEGATIVOS CONSEGUIDOS DIRECTAMENTE A PARTIR DEL FRAS-  
CO DE HEMOCULTIVO CRECIDO.

Hemos utilizado un procedimiento que permite obtener

la identificación directa y pruebas de sensibilidad a los antibióticos de bacilos Gram negativos (enterobacterias y bacilos no fermentadores) a partir de frascos de hemocultivos crecidos. Mediante un proceso de centrifugación se concentran las bacterias existentes en el frasco de hemocultivo y el sedimento bacteriano diluído se utiliza para inocular tarjetas GNI y GNS del Automicrobic System, para conseguir una identificación y pruebas de sensibilidad en un tiempo sensiblemente inferior a los métodos tradicionales.

Hemos utilizado esta técnica con 84 hemocultivos crecidos procedentes de enfermos de nuestro Hospital.

Se consiguieron 61 identificaciones, 72.6 % con dos identificaciones incorrectas y 21 muestras no identificadas (Tablas 28, 29 y 30).

En 75 muestras se obtuvieron pruebas de sensibilidad (89 %) a 11 antibióticos (825 pruebas). De ellas el 94.6 % fueron coincidentes con el método de referencia, siendo el grupo de las Cefalosporinas el que registró mayor número de errores (Tablas 31 y 32).

De los 45 errores producidos, en 9 casos (1 %) pueden ser considerados errores mayores (Tabla 33).

La identificación se obtuvo en un tiempo medio de 6.9 horas y las pruebas de sensibilidad, en 6 horas (Tabla 34).

Nuestros resultados son inferiores en lo que se refieren a identificación a lo conseguido por otros autores, que consiguen un 95 % de identificaciones correctas. Sin embargo, el tiempo en que obtenemos la identificación es menor (125). Por el contrario en las pruebas de sensibilidades, nosotros conseguimos una correlación mayor que estos autores que consiguen un 87 % con un porcentaje de errores mayores del 3.8 % (125).

Hemos realizado un estudio similar con hemocultivos preparados por nosotros con cepas ATCC. Dieciseis frascos de hemocultivo fueron inoculados con varias cepas ATCC, una por muestras y una vez crecidos se practicó la técnica directa, antes expuesta, para conseguir la identificación rápida de las bacterias.

En el 87 % de los casos se obtuvo identificación correcta (Tabla 35), porcentaje algo superior al que encontramos con los hemocultivos procedentes de enfermos. También en un 87 % se consiguieron pruebas de sensibilidad. Entre las identificaciones incorrectas llama la atención una cepa de Shigella sonnei, identificada como Salmonella sp (Tabla 36).

El tiempo medio de identificación en esta serie fué de 7.3 horas y el tiempo medio que se necesitó para la sensibilidad fué de 6.6 horas (Tabla 37).

Esta es una técnica rápida que evita el conseguir colonias en cultivo puro para obtener la identificación y sensibilidad antimicrobiana.

Técnicamente es bastante sencilla y se consiguen diagnosticos microbiológicos en un buen número de casos reduciendo de forma importante el tiempo que necesitan las técnicas convencionales, que por otra parte se deben realizar paralelamente a este método ya que serán necesarias cuando en la técnica rápida se obtengan resultados negativos. Sus principales inconvenientes son que en bacteriemias producidas por más de un microorganismos, los datos obtenidos sobre identificación, no tendrán validez, y que el ser aplicada esta -/técnica a bacteriemia por cocos Gram positivos, los resultados no son satisfactorios.

A pesar de ello, como la mayoría de las bacteriemias son producidas por una bacteria y los bacilos Gram negativos son los que con mayor frecuencia las producen, esta es una técnica de gran utilidad en el diagnóstico rápido de - la septicemia.

## EXUDADO DE PETEQUIA EN SEPSIS MENINGOCOCICA

La sepsis meningocócica es una entidad bastante frecuente en nuestro país (166, 183), y de enorme gravedad y evolución rapidísima.

En un buen número de casos (183) no se aísla N.meningitidis en hemocultivo debido seguramente a una antibioterapia previa, o al posible efecto tóxico del polianetol sulfonato (componente que con frecuencia poseen los frascos de hemocultivo) (29, 152). No obstante, aunque se realice el aislamiento de N. meningitidis a partir de hemocultivos, la lentitud con que se produce (24-48 horas como mínimo) en muchos casos sólo sirve como diagnóstico retrospectivo o confirmación diagnóstica con poco o ningún valor para el enfermo.

Por ello es de gran interés el utilizar otro tipo de técnicas en el diagnóstico de esta enfermedad, que con mayor rapidez permite hacer o confirmar un juicio diagnóstico e instaurar la terapéutica apropiada.

En este sentido hemos estudiado una tinción de Gram del exudado de la petequia como método diagnóstico rápido de sepsis meningocócica. Se consideró la prueba positiva cuando se observaron diplococos Gram negativos con morfolo

gía típica del género Neisseria.

El método se realizó en noventa y cinco enfermos con sospecha de sepsis meningocócica. En 67 casos se confirmó el diagnóstico clínico (rash purpúrico, alteraciones hemodinámicas, coagulación intramuscular diseminada (Tabla 38) De estos enfermos, en 48 (71.6 %) el exudado de petequia / fué positivo y el hemocultivo en 16 ocasiones (23.8 %). En los 28 enfermos en que se descartó el diagnóstico de sepsis meningocócica, el hemocultivo fué negativo en todos ellos mientras que el exudado de petequia fué negativo en 26 y - fueron positivos 2 casos cuyo diagnóstico definitivo fué - P.T.I. y Parotiditis (7.1 % de falsos positivos) (Tablas / 39 y 40).

Con el exudado de petequia se obtuvo en este estudio una sensibilidad del 71.6 % y una especificidad del 92.8 % y con los hemocultivos una sensibilidad del 23.8 % y una - especificidad del 100 % (Tablas 41 y 42).

El exudado de petequia es una técnica sencilla, rápida y que si es realizada por personal especializado, confirma la sospecha de sepsis meningocócica en un elevado número - de casos, con un porcentaje pequeño de falsos positivos . Su principal ventaja es la rapidez, ya que pueden obtenerse resultados en menos de una hora y su principal limitada -

ción que se necesita disponer de personal experto, tanto para la toma de la muestra como para su observación al microscopio que debe ser prolongada y muy cuidadosa ya que el número de bacterias es muy escaso.

#### BACTEC NR-660

Con el objeto de conseguir una rápida detección del crecimiento bacteriano en los frascos de hemocultivo, hemos examinado durante cinco días consecutivos 1230 frascos de hemocultivo (615 aerobios y 615 anaerobios) procedentes de enfermos, en los que visualmente no había signos macroscópicos del crecimiento, con el sistema Bactec NR-660 que es un sistema automatizado, no radiométrico para detección de microorganismos en botellas de hemocultivo midiendo la producción de CO<sub>2</sub> como indicador biológico de crecimiento.

De todos los frascos de hemocultivo, en 179 casos -/ (14.4 %) la lectura de CO<sub>2</sub> sobrepasó la cifra de 35 (umbral establecido para considerar un hemocultivo positivo) y de éstos, en 15 ocasiones (8.3 %) no se aisló ninguna bacteria considerándose el hemocultivo falso positivo.

La sensibilidad del método en este estudio fué de -/ 100 %, la especificidad 98.6 %, el valor predictivo positivo 91 % y el valor predictivo negativo 100 % (Tabla 43).

Si separamos los hemocultivos positivos por este sistema, según la lectura de CO<sub>2</sub> que se obtuvo (Tabla 44), nos damos cuenta que la mayor cantidad de falsos positivos se dan en las lecturas comprendidas entre 35 y 40, siendo muy escasos en los valores 41 a 50 e inexistentes en valores superiores a 50. Sin embargo, no se puede subir el umbral a 40 puesto que en el rango 35-40 también se obtienen resultados positivos. De los hemocultivos positivos, 62 (34 %) fueron detectados en las primeras 24 horas y 110 (61 %) en los dos primeros días (Tabla 45).

En la Tabla 46, se detallan los microorganismos aislados en frascos aerobios y en frascos anaerobios y podemos observar, que los anaerobios facultativos crecen indistintamente en cualquiera de los frascos, y que las bacterias anaerobias estrictas crecen preferentemente en los frascos anaerobios (aunque alguna se aisló de frascos aerobios); y por el contrario Pseudomonas aeruginosa y Cándida albicans, sólo se aislaron de botellas aerobias.

Los subcultivos efectuados el 5º día de frascos que habían sido negativos con el sistema Bactec, fueron todos negativos, confirmando datos de otros autores (18).

Bactec NR-660, es un sistema a nuestro juicio eficaz para detectar de forma rápida el crecimiento bacteriano en

frascos de hemocultivos. Es posible que se obtenga resultados similares en cuanto a rapidez utilizando técnicas como tinción con naranja de acridina o subcultivos rutinarios - al poco tiempo de la extracción (63, 105, 123, 167), pero sin duda con una carga de trabajo mucho mayor para el laboratorio.

Además el sistema NR-660 proporciona una automatización (gracias a un computador), de los exámenes de hemocultivos programando el tiempo que los frascos permanecen en el sistema para ser estudiados; durante el trabajo diario organiza e indica qué bandejas y en qué orden deben ser leídas; después de cada lectura informa inmediatamente de los resultados; y guarda en memoria los resultados obtenidos de forma que están disponibles para ser utilizados en cualquier momento.

Todo esto simplifica el trabajo y es de gran utilidad en laboratorios que procesan gran cantidad de hemocultivos diarios.

#### MENINGITIS BACTERIANA AGUDA

La meningitis bacteriana aguda es todavía una enfermedad de gran importancia, tanto por su elevada incidencia que se calcula en 5-8 casos por 100000 habitantes, en los -

países desarrollados (60), como por su elevada mortalidad, que aunque disminuyó de forma importante con la introducción en la terapéutica de quimioterápicos y antibióticos, se mantiene estable durante los últimos años. La mortalidad se puede cifrar entre un 7-15 % dependiendo fundamentalmente de la etiología (3, 60). Efectivamente, el pronóstico varía ampliamente según el agente etiológico, siendo los bacilos Gram negativos y S. pneumoniae los que producen mayor mortalidad (60). En ocasiones existen variaciones de tipo geográfico, hasta para la misma bacteria, como sucede con la meningitis por S. pneumoniae cuya mortalidad / es sensiblemente más alta en las estadísticas africanas que en las europeas (14, 25).

Por lo tanto, el diagnóstico microbiológico es de -/ una extraordinaria importancia. No cabe duda de la utilidad de los procedimientos microscópicos y del cultivo. El examen microscópico del sedimento teñido del líquido cefalorraquídeo es una práctica necesaria e inexcusable en el diagnóstico de las meningitis. Aunque la tinción de Gram ha sido siempre la técnica de elección para estos casos, en los últimos tiempos, se considera por algunos autores superior - la tinción de naranja de acridina (98, 105). Por otra parte el cultivo de líquido cefalorraquídeo, en caso de ser - positivo es el que nos va a proporcionar el diagnóstico definitivo. Además su interés se ha acrecentado desde que se

conoce que algunas bacterias como S.pneumoniae y H.influenzae presentan resistencia a antibióticos a los que eran regularmente sensibles (1, 111, 154).

Sin embargo, con cierta frecuencia hay meningitis bacterianas agudas en las que los exámenes bacteriológicos habituales (Gram y cultivo) no consiguen detectar el agente patógeno. Esto ocurre en el 9-26 % de todos los casos de meningitis purulenta (144).

Esta negatividad de los exámenes microbiológicos que se pueden deber a variadas causas, hace necesario el uso de otras técnicas que puedan ayudar a conseguir el diagnóstico etiológico y que por otra parte sean lo más rápidas posibles. De esta forma se aplicaron el diagnóstico de las meningitis bacterianas técnicas inmunológicas que detectan antígenos bacterianos y que por otra parte son de una extraordinaria rapidez.

Numerosos autores se han ocupado de comprobar la utilidad clínica de la aglutinación de látex y coaglutinación en el diagnóstico microbiológico de las meningitis (33,51, 73, 88, 175, 194, 199).

Estos autores se ocupan, bien de aglutinación de látex, bien de coaglutinación o de ambas a la vez, comparán

dolas en ocasiones entre sí o con otras técnicas (CIE, Gram, cultivo). Todos ellos están de acuerdo en que cualquiera - de los dos métodos detectan un número importante de antígenos bacterianos en líquido cefalorraquídeo y que por tanto su uso se puede considerar de gran interés en el diagnóstico de la meningitis bacteriana.

Nosotros hemos tratado de conocer mejor la sensibilidad y especificidad de la aglutinación de látex, coagulación y ELISA.

Para ello hemos hecho suspensiones en líquido cefalorraquídeo estéril, previamente comprobado, a una concentración al 0.5 de MacFarland con los siguientes microorganismos: Neisseria meningitidis grupo B, Streptococcus pneumoniae y Haemophilus influenzae tipo b. De estas suspensiones se hicieron 7 diluciones (Tabla 47) para tener distintas concentraciones de las bacterias. Con todas ellas se / probaron aglutinación de látex (Bactigen de Wampole Laboratories) y coagulación (Phadebact CSF Test de Pharmacia Diagnostica), con el fin de conocer su sensibilidad a estas bacterias. Las dos últimas diluciones que resultaron positivas y las dos primeras negativas, se repitieron varias veces para ver la reproductividad. Las diluciones de Neisseria meningitidis se probaron también con una técnica de ELISA para diagnóstico de N. gonorrhoeae, ya que al te-

ner esta técnica reacciones cruzadas con otras Neisserias, también las podría tener con N. meningitidis.

Todas las diluciones se sembraron también en medios adecuados para conocer las CFU/ml. de cada una.

Los resultados fueron los siguientes: la aglutinación de látex detectó antígenos bacterianos de S. pneumoniae -/ hasta la suspensión que contenía 45000 CFU/ml. (una dilu - ción al 1/10 más que coaglutinación) (Tabla 47); hasta la suspensión que contenía 40000 CFU/ml. de H. influenzae (una dilución 1/8 más que coaglutinación) y N. meningitidis -/ hasta una suspensión que contenía 11000 CFU/ml (una dilu - ción 1/30 más que coaglutinación). Las pruebas que se repi - tieron dieron el mismo resultado (Tablas 48, 49, 50, 51 y 52).

Coaglutinación detectó antígenos de S. pneumoniae y N. meningitidis en suspensiones que contenían como mínimo  $1.5 \times 10^5$  CFU/ml. y antígenos de H. influenzae en la sus - pensión que contenía 120000 CFU/ml. También con las suspen - siones que se repitieron se obtuvieron los mismos resulta - dos (Tablas 47, 48, 49, 50, 51 y 52).

Con el método de ELISA se detectó antígeno de N. me - ningítidis en la suspensión que contenía 3000 CFU/ml. (una

dilución 1/4 más que aglutinación de látex). Con las repeticiones se obtuvieron los mismos resultados (Tablas 51 y 52).

En este estudio, aglutinación de látex se mostró más sensible que coaglutinación, detectando antígenos bacterianos a concentraciones más bajas. Esto está de acuerdo con los resultados obtenidos por otros autores que diluyendo / muestras clínicas de líquido cefalorraquídeo con H. influenzae y probando estas técnicas en las diluciones, encontraron mayor sensibilidad con látex que con coaglutinación / (33).

Por otra parte nuestros resultados están de acuerdo con otros trabajos de autores que señalan que coaglutinación no detecta antígenos a concentraciones menores de  $10^5$  CFU/ml.

ELISA es la técnica que se ha mostrado más sensible para detectar N. meningitidis, a pesar de utilizar anticuerpos frente a N. gonorrhoeae. Ha sido capaz de detectar antígenos en suspensiones con 3000 CFU/ml.

También se realizaron pruebas de especificidad con los tres métodos (Tablas 53, 54 y 55). Coaglutinación y látex con anticuerpos frente a S. pneumoniae, H. influenzae y

N. meningitidis se enfrentaron a Streptococcus grupos B y D, Bordetella bronchiseptica, Klebsiella pneumoniae y N. meningitidis. Aunque algunos autores han encontrado alguna - reacción cruzada (194), en nuestros resultados no hemos encontrado ningún falso positivo, lo que confirma la especificidad encontrada por otros autores (88, 175, 199). No ha ocurrido lo mismo con la técnica ELISA con anticuerpos -/ frente a N. gonorrhoeae donde además de los microorganismos anteriores probamos Neisseria sicca y como era de esperar nos encontramos con reacciones cruzadas frente a N. meningitidis y N. sicca, y también encontramos reacciones -/ cruzadas frente a B. bronchiseptica. Sin embargo, como es realmente muy improbable que B. bronchiseptica u otra Neisseria distinta de N. meningitidis, puedan encontrar en líquido cefalorraquídeo, creemos que esta técnica se puede / aplicar perfectamente al diagnóstico de N. meningitidis en meningitis purulenta.

Nos encontramos frente a unas técnicas muy rápidas, sensibles y específicas (a excepción de ELISA) que junto - con las técnicas clásicas pueden suponer una ayuda importante al diagnóstico rápido de las meningitis bacterianas agudas.

## VI. CONCLUSIONES

## VI. CONCLUSIONES

- 1ª. Un diagnóstico rápido en Microbiología Clínica es de gran utilidad ya que el conocer el agente etiológico en un periodo de tiempo corto, permite emplear una terapia antibiótica adecuada que puede variar sin duda el pronóstico de la enfermedad. / Este diagnóstico rápido en procesos graves que -/ hace peligrar la vida del enfermo y que pueden - ser producidos por diferentes microorganismos, ad- quiere una mayor relevancia.
  
- 2ª. El coste económico de algunas técnicas rápidas / puede ser elevado; sin embargo, en ocasiones un diagnóstico rápido va a influir en acortar el tiempo de hospitalización y por lo tanto va a producir un beneficio económico que puede compensar el coste de los métodos rápidos. Es preciso por tanto - evaluar cuidadosamente el coste / beneficio de - las pruebas.
  
- 3ª. Como indicadores de bacteriuria significativa, la utilización combinada de la reducción de nitra-tos a nitritos y detección de esterasa leucocitaria realizada con tiras reactivas, es una técnica sencilla y de gran rapidez. Sin embargo, dada,

su escasa sensibilidad no recomendamos su utilización como técnica única.

- 4ª. Según los resultados obtenidos, podría utilizarse este procedimiento en laboratorios con gran cantidad de muestras como método de selección para aplicar posteriormente otro tipo de técnicas de elevado coste.
- 5ª. La tinción de Gram de orina sin centrifugar es / una técnica sencilla, barata, rápida y sensible que se puede considerar como método de elección para la detección rápida de bacteriuria en determinados casos. Sin embargo, para ser aplicada a todas las orinas en laboratorios con gran volumen de muestras, supone una gran carga de trabajo.
- 6ª. Los resultados obtenidos con la tinción de Gram y la de naranja de acridina, son muy similares - con una ligera mayor sensibilidad a favor de la tinción de naranja de acridina y una mayor especificidad para la tinción de Gram.
- 7ª. Automicrobic System es un sistema automático, que analizando directamente la orina, proporciona el

recuento de colonias correcto en el 97 % de los casos y la identificación de los microorganismos que se encuentran en la muestra, en el 92 % en un tiempo medio de 7.5 horas. No obstante, en muestras que contienen concentraciones bajas de microorganismos, los resultados son menos satisfactorios. Pueden ser de utilidad en laboratorios con gran número de muestras, siempre que se utilice un sistema de selección previo de las orinas ya que su coste es elevado.

8ª. La técnica de identificación y sensibilidad de bacilos Gram negativos, partiendo directamente de los frascos de hemocultivos, con Automicrobic System es un sistema técnicamente sencillo que nos permite conocer la identificación del agente etiológico de las bacteriemias y su sensibilidad a los antibióticos en un número importante de casos (72 % y 89 %) y en un periodo de tiempo sensiblemente inferior a las técnicas tradicionales (media de 7 horas).

9ª. La tinción de Gram del exudado de petequia es una técnica sencilla, rápida y poco costosa que cuando se realiza por personal especializado, confirma la sospecha de sepsis meningocócica en un

elevado número de casos (71 %), con un bajo porcentaje de falsos positivos ( 7 %).

- 10ª. Bactec NR 660 es un sistema eficaz para detectar de forma rápida el crecimiento bacteriano en -/ frascos de hemocultivos. El bajo número de falsos positivos (8 %) y la automatización que proporciona, reduce de forma importante el trabajo en laboratorios con gran número de muestras.
- 11ª. Coaglutinación y aglutinación de látex son dos -/ técnicas sensibles y específicas para el diagnóstico de meningitis por Neisseria meningitidis, / Streptococcus pneumoniae y Haemophilus influenzae, ya que detectan antígenos en concentraciones inferiores a las encontradas por término medio en líquidos cefalorraquídeos de meningitis sin tratar.
- 12ª. En los estudios de sensibilidad realizados, la / prueba de látex se ha mostrado sistemáticamente superior a la de Coaglutinación.
- 13ª. La técnica de ELISA (Gonozyme) para la detección de Neisseria gonorrhoeae, aplicada al diagnóstico de Neisseria meningitidis en líquido cefalorraquídeo ha demostrado ser más sensible aunque menos -

específica que las técnicas de aglutinación. Sin embargo, como es muy improbable que Neisseria gonorrhoeae o bacterias que presentan reacciones cruzadas como Neisseria sicca o Bordetella bronchiseptica, pueden encontrarse en líquido cefalorraquídeo, esta técnica se puede aplicar perfectamente al diagnóstico de las meningitis purulentas en las que se sospecha Neisseria meningitidis.

- 14<sup>a</sup>. Las técnicas rápidas no vienen a sustituir a las técnicas tradicionales sino que colaboran con ellas al diagnóstico de las enfermedades infecciosas ofreciendo de una forma rápida datos que pueden orientar el diagnóstico y tratamiento en las horas a veces críticas que pasan hasta que los resultados de los cultivos y pruebas de sensibilidad están disponibles.

VII. BIBLIOGRAFIA

VII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aguirre JM, Guerrero JL, Rubio T, Berdun MA, Mosquera JD, Aisa ML, Muñoz JR. Meningitis por Neumococo resistente a penicilina. II Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. / Palma de Mallorca 26-28 Mayo 1986.
- 2.- Aguirre JM, Rubio T, Guerrero JL, Mosquera JD, Berdun MA, Marco ML, Muñoz JR. Meningitis por Listeria monocytogenes. II Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Palma de Mallorca 26-28 Mayo 1986.
- 3.- Alcoba Leza M, Naveira C, López González R, Carro JA, Menéndez Gutiérrez ML, Palau MT. Meningitis aguda bacteriana. Análisis sobre la mortalidad en una serie de 406 casos. Rev Clin Esp 1985; 177: 268-272.
- 4.- Aldridge C, Jones PW, Gibson S, Lanham J, Meyer M, Van nest R, Charles R. Automated microbiological detection/identification system. J Clin Microbiol 1977; 6:406-413.
- 5.- Alexanter DN, Ederer GM, Matsen JM. Evaluation of an adenosine 5-triphosphate assay as a screening method to detect significant bacteriuria. J Clin Microbiol 1976;3: 42-46.

- 6.- Anhalt JP, Kenny GE, Rytel MW. Detection of microbial antigens by counterimmunoelectroforesis. Gavan TL (ed) Cumitech 8. Am Soc Microbiol. Washington DC. 1978.
- 7.- Appelbaum PC, Beckwith DG, Dipersio JR, Dyke JW, Salventi JF, Stone LL. Enhanced detection of bacteriemia with a new bactec resin blood culture medium. J Clin Microbiol 1983; 17:48-51.
- 8.- Appleman MD, Swinney RS, Reseltine PNR. Evaluation of the antimicrobial removal. J Clin Microbiol 1982; 15: 278-281.
- 9.- Aragón C, Fernández A, Cerda E, Lázaro A, Guerra L. Sepsis en cuidados intensivos. II Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Palma de Mallorca 26-28 Mayo 1986.
- 10.- Aristegui J, Cos B, Castellet J, Cisterna R, Delgado A. Diagnóstico rápido de la bacteriuria significativa mediante bioluminiscencia. Enf Inf Microbiol Clin 1985; 4:17-19.
- 11.- Arneil GC, McAllister TA, Kay P. Measurement of bacteriuria by plane dipslide culture. The Lancet 1973; 1: 94-95.

- 12.- Asscher AW, McLachlan MSF, Verrier Jones R, Meller S, Sussman M, Harrison S, Johnston HH, Sleight G, Fletcher EW. Screening for asymptomatic urinary-tract infection in schoolgirls. The Lancet 1973; 2:1-4.
- 13.- Backes A, Cavalieri J, Rudrik JT, Britt EU. Rapid antimicrobial susceptibility testing of Gram-negative clinical isolates with the automicrobic system. J Clin Microbiol 1984; 19:744-747.
- 14.- Baird DR, Whittle HC, Greenwood BM. Mortality from pneumococcal meningitis. Lancet 1976; 2:1344-1346.
- 15.- Barry AL, Smith PB, Turck M. Laboratory diagnosis of urinary tract infections. Gavan TL (ed) Cumitech 2. Am Soc Microbiol 1975. Washington DC.
- 16.- Bartlett RC, Galen RS. Predictive value of urine culture. Am J Clin Pathol 1983; 79:756-757.
- 17.- Bayardelle P, Richet H. Rapid screening for bacteriuria with a laser nephelometer. Can J Microbiol 1984; 30:927-929.
- 18.- Beckwith DG, Etowski DC. Evaluation of the necessity for routine terminal subculturing of blood cultures

- negative by radiometric methods. J Clin Microbiol 1982; 15:35-40.
- 19.- Berenguer Berenguer J, Martínez Martínez R, Cogollos Agruña MR, Díaz Mediavilla J. Bacteriemia persistente por *Corynebacterium* sp polirresistente en un paciente leucémico. Med Clin 1986; 86:719-720.
- 20.- Brooks GF, Pribble AH, Beaty HN. Early diagnosis of - bacteriemia by buffy-coat examinations. Arch Intern / Med 1973; 132:673-675.
- 21.- Brown DFJ, Warner M. Impedance and conductivity methods for detecting bacteriuria. En Tilton Rc (ed). Rapid Methods automation in Microbiology. Washington 1981; 171-175.
- 22.- Brulles A, Lloveras J, Caralps A, Andreu J, Masramon J, Gil Vernet JM. Infecciones urinarias después del trasplante renal. Rev Clin Esp 1979; 152:17-19.
- 23.- Burdash NM, Manos JP, Bannister ER, Welborn AL. Acridi ne orange staining and radiometric detection of microorganisms in blood cultures. J Clin Microbiol 1983;17: 463-465.

- 24.- Burdash NM, West ME. Identification of Streptococcus pneumoniae by the Phadebact coagglutination test. J Clin Microbiol 1982; 15:391-394.
- 25.- Cadoz M, Denis F, Chiron JP, Sow A, Diopmar I. Prognostic et traitement des méningites a pneumocoque en -/ Africa . 402 observations. Nov Press Med 1979; 8:573-576.
- 26.- Cady P, Dufour SW, Lawless P, Nunke B, Kraeger SJ. Impedimetric screening for bacteriuria. J Clin Microbiol 1978; 7: 273-278.
- 27.- Calvin MK, Degroot JE. Self-screening for significant bacteriuria evaluation of dip-strip combination nitrite/culture test. Jama 1975; 231:1349-1353.
- 28.- Campos J. Detección precoz de la bacteriemia infantil con naranja de acridina. Enf Infec Microbiol Clin 1985; 3:158-160.
- 29.- Campos Marques J, Sanfeliu Sala I . Neutralización por la sangre humana del efecto tóxico de polianetol sulfonato sobre N. meningitidis. Infectologica 1983; IV: 25-28.

- 30.- Campos Marques J, Sanfeliu Sala I. El hemocultivo en pediatría: estudio de 353 pacientes bacteriemicos .  
Enf Infec Microbiol Clin 1984; 2:193-197.
- 31.- Carey RB. Clinical comparison of the isolator 1.5 microbial tube and the Bactec radiometric system for detection of bacteremia in children. J Clin Microbiol 1984; 19:634-638.
- 32.- Colding H, Lind I. Counterimmunoelectrophoresis in the diagnosis of bacterial meningitis. J Clin Microbiol -/  
1977; 5:405-409.
- 33.- Collins JK, Kelly MT. Comparison of Phadebact coagglutination Bactogen latex agglutination, and counterimmunoelectrophoresis for detection of Haemophilus influenzae type B antigens in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol 1983; 17:1005-1008.
- 34.- Conn RB, Carache P, Chapelle FW. Limits of applicability of luminiscence ATP assay for the detection of bacteria in clinical specimens. Am J Clin Pathol 1975; 63:493-499.
- 35.- Coonrod JD. Agglutination techniques for the detection of microbial antigens: methodology and overview. En -

- Coonrod, Kunz, Ferrero (ed) The direct detection of -  
microorganisms in clinical samples. New York 1983;135-  
142.
- 36.- Coonrod JD, Bauer R. Latex agglutination in the diagno-  
sis of pneumococcal infection. J Clin Microbiol 1976 ;  
4:168-174.
- 37.- Coonrod JD, Leach RP. Immuno-electrophoresis for detec-  
tion of polysaccharides in immune complexes. J Clin -  
Microbiol 1978; 8:257-259.
- 38.- Coonrod JD, Rytel MW. Determination of aetiology of -  
bacterial meningitis by counter-immunoelectrophore-  
sis. The Lancet 1972; 1:1154-1157.
- 39.- Costigan WJ, Hollick GE. Use of the Autobac IDX system  
for rapid identification of Enterobacteriaceae and -  
nonfermentative Gram-negative bacilli. J Clin Micro-  
biol 1984; 19:301-302.
- 40.- Crawford G, Brancato F, Holmes KK. Streptococcal pha-  
ryngitis: diagnosis by Gram stain . Ann Intern Med -/  
1979; 90:293-297.
- 41.- Czerwinski AW, Wilkerson RG, Merrill JA, Braden B, -

Colmore JP. Further evaluation of the Griess test to detect significant bacteriuria. Amer J Obstet Gynec 1971; 110:677-681.

42.- Chaves Sánchez F, Martínez Huedo S, Jorge Calvo P, Porreres Cubero A, Carrero González P, García Garbajosa S. Detección rápida de bacteriuria. Selección de urocultivos. Rev Esp Microbiol Clin 1986; 1:55-58.

43.- Dajani AS. Agglutination tests for the diagnosis of meningitis en Coonrod, Kunz, Ferraro (ed). The direct detection of microorganisms in clinical samples. New York 1983; 143-152.

44.- De Girolami PC, Mepani CP. Evaluation of a direct fluorescent antibody staining method for rapid identification of members of the Bacteroides fragilis group. Am J Clin Pathol 1981; 76:78-82.

45.- Del Valle A, Rodríguez J, Méndez J, Martínez A, De Oña M. Diagnóstico de la infección gonocócica por técnica inmunoenzimática. I Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Sevilla 16-19 Mayo 1984.

46.- Denis F, Samb A, Chiron JR. Bacterial meningitis diag

- nosis by counterimmunoelectrophoresis. *Jama* 1977; 238:1248-1249.
- 47.- Denis F, Mounier M. Le diagnostic rapide des meningites crerebrospinales. *Med Malad Infec* 1984; 14:27-36.
- 48.- Dorn GL, Burson GG, Haynes JR. Blood culture technique based on centrifugation: clinical evaluation. *J Clin Microbiol* 1976; 3:258-263.
- 49.- Dove GA, Bailey AJ, Gower PE, Roberts AP, Wardener HE. Diagnosis of urinary-trac infection in general practice. *The Lancet* 1972; 2:1281-1283.
- 50.- Dove GA, Gower PE. Suprapubic aspiration in general practice. *The Lancet* 1977; 2:304
- 51.- Drow DL, Welch DF, Hensel D, Eisenach K, Long E, Sli-fkin M. Evaluation of the Phadebact CSF test for detection of the four most common causes of bacterial meningitis. *J Clin Microbiol* 1983; 18:1358-1361.
- 52.- Edwards EA, Coonrod JD. Coagglutination and counterimmunoelectrophoresis for detection of pneumococcal antigens in the sputum of pneumonia patients. *J Clin Microbiol* 1980; 11:488-491.

- 53.- Edwards EA, Muehl PM, Peckinpaugh RO. Diagnosis of -  
Bacterial meningitis by counterimmunoelectrophoresis.  
J Lab Clin Med 1972; 80:449-454.
- 54.- Edwards MS, Kasper DL, Baker CJ. Rapid diagnosis of -  
type III group B Streptococcal meningitis by latex -  
particle agglutination. J Pediatric 1979; 95:202-205.
- 55.- Faden HS. Early diagnosis of neonatal bacteremia by  
buffy-coat examination. J Pediatric 1976; 88:1032-1034
- 56.- Fairley KF, Bond AG, Brown RB, Habersberger P. Simple  
test to determine the site of urinari-tract infection  
Lancet 1967; 2:427-428.
- 57.- Fernández del Campo J, Romero Vivas J, Pérez Cayuela  
P, Rodríguez Creixems M, Loza E, Lazaro P, Lozano C.  
Bacteriemia por *S. pneumoniae*. I Congreso de la Socie-  
dad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología  
Clínica. Sevilla 16-19 Mayo 1984.
- 58.- Fernández Guerrero ML, Aguado JM, Gómez Garcés JM. -  
Bacteriemia por *Staphylococcus aureus* asociada a caté-  
ter venoso. II Congreso de la Sociedad Española de En-  
fermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Palma  
de Mallorca 26-28 Mayo 1986.

- 59.- Fernández Guerrero ML, Gómez Garcés JL, Alex Reinlein JM. Experiencia actual en el diagnóstico y tratamiento de la sepsis por bacilos Gram-negativos. Rev Clin Esp 1979; 153:263-268.
- 60.- Fernández Viladrich P, Gudiol F, Rufi G, Ariza J, Pallerés R, Casanova A, Verdaguer R, Fernández Nogues F. Meningitis bacteriana. Etiología y focos de origen de 482 episodios. Med Clin 1968; 86:615-620.
- 61.- Flick MR, Cluff LE. Pseudomonas bacteremia review of 108 cases. Am J Med 1976; 60:501-508.
- 62.- Fontanals D, Van Ezzo D, Pineda V, Melo M. Tinción directa de Pappenheim Cristallovitx en meningitis bacteriana. II Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Palma de Mallorca 26-28 Mayo 1986.
- 63.- Ganguli LA, O'Hare W Hyde WA. Rapid detection of bacteremia by aely-subculture. J Med Microbiol 1984; 17:311-315.
- 64.- García de la Torre M, Romero Vivas J, Martínez Beltran J, Guerrero A, Meseguer M, Bouza E. Klebsiella bacteremia - an analysis of 100 episodes. Rev Infect Dis 1985; 7:143-150.

- 65.- García de la Torre M, Sampelayo TH, Cercenado E, Bernaldo de Quirós JCL, Rodríguez-Creixems M, Bouza E. Estudio prospectivo de bacteriemia en el Hospital Provincial de Madrid. II Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Palma de Mallorca 26-28 Mayo 1986.
- 66.- García Flores A, Torne J, Verdaguer A, Torres JM, Drobnic L. Estudio prospectivo de 278 episodios bacteriemicos en un Hospital General. II Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Palma de Mallorca 26-28 Mayo 1986.
- 67.- García López M, Villota J, Martín P, Barreiro G, Pérez MLP, González-Toba C, Mellado MJ, Cilleruelo MJ. Meningitis purulentas en la infancia. II Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Palma de Mallorca 26-28 Mayo 1986.
- 68.- García Rodríguez JA. Estructura bacteriana I. En Microbiología y Parasitología Médicas. Salvat Editores (Barc) 1984; 23-31.
- 69.- Gargan RA, Brumfitt W, Hamilton-Miller JMT. Do anaerobes cause urinary infection? Lancet 1980; 1:37.

- 70.- Geiseler PJ, Nelson KW, Levin S, Reddi KT, Moses VK. Community-acquired purulent meningitis: A review of 1316 cases during the antibiotic era 1954-1976. *Rev Infect Dis* 1980; 2:725-745.
- 71.- Goldacre MJ. Acute bacterial meningitis in childhood. Incidence and mortality in a defined population. *Lancet* 1979; 1:28-31.
- 72.- Greenwood BM, Whittle HC, Dominic-Rajkovic O. Counter current immunoelectrophoresis in the diagnosis of meningococcal infections. *Lancet* 1971; 2:519-521.
- 73.- Guiscafre HG, Marrufo CE, Trejo JA, Ramírez M, González S, Muñoz O. Meningoencefalitis por *H. influenzae* y *S. pneumoniae*: diagnóstico rápido por coagulación en líquido cefalorraquídeo. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1984; 41:262-267.
- 74.- Gutiérrez Calzada J, Aznar R, Rodríguez Medina J, Fernández E. Bacteriemia por *Campylobacter fetus* spp *fetus*: ¿una entidad infrecuente?. *Enf Infec Microbiol Clin* 1985; 3:285-286.
- 75.- Hale DVH, Wright DN, McKie JE, Isenberg HD, Jenkins RD, Matsen JM. Rapid screening for bacteriuria by

- scatter photometry (Autobac): A collaborative study.  
J Clin Microbiol 1981; 13:147-150.
- 76.- Hall MM, Mueske CA, Ilstrump DM, Washington JA. Evaluation of a biphasic medium for blood cultures. J Clin Microbiol 1979; 10:673-676.
- 77.- Halverstadt DB, Leadbeter GW, Field RA. Pyelonephritis in the diabetic. Jama 1966; 195:139-141.
- 78.- Harriette LN, Dolan E, Mele L, Kurtz SR. Accuracy and reproductibility of the Automicrobic system Gram-negative general susceptibility-plus card for testing selected challenge organisms. J Clin Microbiol 1985; 22:355-360.
- 79.- Henry NK, McLimans CA, Wright AJ, Thompson RL, Wilson WR, Washington JA II. Microbiological and clinical evaluation of the isolator lysis-centrifugation blood culture tube. J Clin Microbiol 1983; 17:864-869.
- 80.- Herlihy RE, Wilkerson R, Roy JB. New and rapid method for detection of pyuria by leukocyte esterase reaction Urology 1984; 23:148-149.
- 81.- Holm S, Wahlin A, Wahlquist L, Wedren H, Lundgren B. Uri-

- ne microscopy as screening method for bacteriuria. Ac  
ta Med Scand 1982; 211:209-212.
- 82.- Holland JW, Stauffer LR, Altemeier WA. Fluorescent an  
tibody test kit for rapid detection and identificaa -  
tion of members of the Bacteroides fragilis and Bacte-  
roides melaninogenicus groups in clinical specimens.  
J Clin Microbiol 1979; 10:121-127.
- 83.- Isenberg HD, Gavan TL, Sonnenwirth A, Taylor WI, -/  
Washington JA. Clinical laboratory evaluation of autoo  
mated microbial detection/ identification system in -  
analysis of clinical urine specimens. J Clin Micro -/  
biol 1979; 10:226-230.
- 84.- James GP, Paul KL, Fuller JB. Urinary nitrite and urii  
nary-tract infection. Am J Clin Pathol 1978; 70:671-  
678.
- 85.- Jenkins RD, Hale DC, Matsen JM. Rapid semiautomated  
screening and processing of urine specimens. J Clin  
Microbiol 1980; 11:220-225.
- 86.- Johnston HH, Mitchell CJ, Curtis GDW. An automated -/  
test for the detection of significant bacteriuria. -/  
Lancet 1976; 2:400-402.

- 87.- Jorgensen JH, Jones PM. Comparative evaluation of the limulus assay and the direct Gram stain for detection of significant bacteriuria. Am J Clin Pathol 1975;63:142-148.
- 88.- Kaldor J, Asznovicz R, Buist DGP. Latex agglutination in diagnosis of bacterial infections with special reference to patients with meningitis and septicemia. Am J Clin Pathol 1977; 68:284-289.
- 89.- Kamm W, Bille J. Evaluation of a rapid latex agglutination test (directigen) for the direct detection of -/ group A Streptococci from throat swabs. Infection 1985; 13:179-181.
- 90.- Kasper DL, Fiddian AP, Tabaqchali S. Rapid diagnosis of Bacteroides infections by indirect immunofluorescence - assay of clinical specimens. Lancet 1979; 1:239-242.
- 91.- Kass EH.- Asymptomatic infections of the urinary tract. Trans Assoc Am Physicians 1956; 69:56-64.
- 92.- Kellogg JA, Manzella JP, McConville JH. Clinical laboratory comparison of the 10 ml. Isolator blood culture system with Bactec radiometric blood culture media. J Clin Microbiol 1984; 20:618-623.

- 93.- Kelly MT, Balfour LC. Evaluation and optimization of urine screening by Autobac. J Clin Microbiol 1981; 13: 677-680.
- 94.- Kelly MT, Hale DC, Matsen JM. Rapid identification by the micro-id system of Enterobacteriaceae detected by urine screening. J Clin Microbiol 1981; 14:295-297.
- 95.- Kelly MT, Latimer JM, Balfour LC. Comparison of three automated systems for antimicrobial susceptibility testing of Gram-negative bacilli. J Clin Microbiol 1982 ; 15:902-905.
- 96.- Kenny GE. Counterimmunoelectrophoresis for the diagnosis of pneumococcal respiratory and other infections. En Coonrod, Kunz, Ferraro (ed) . The direct detection of Microorganisms in Clinical Samples. New York 1983; 105-111.
- 97.- Kleiman MB, Reynolds JK, Schreiner RL, Smith JW, Allen SD. Rapid diagnosis of neonatal bacteremia with acridine orange-stained buffy coat smears. J Pediatric 1984; 105:419-421.
- 98.- Kleiman MB, Reynolds JK, Watts NH, Schreiner RL, Smith JW. Superiority of acridine orange stain versus Gram

- stain in partially treated bacterial meningitis. Clin Lab Observation 1984; 104:401-404.
- 99.- Kracke RR, Teasley HE. The efficiency of blood cultures with report of a new method based on complement fixation. J Lab Clin Med 1930; 16:169-182.
- 100.- Kronvall G. Differential staining of bacteria in clinical specimens using acridine orange buffered at low pH. Acta Pathol Microbiol Scand 1977; 85:249-252.
- 101.- Kronwall G. Rapid slide agglutination method for typing pneumococci by means of specific antibody adsorbed to protein A containing staphylococci. J Med Microbiol 1973; 6:187-190.
- 102.- Kunz LJ. Microscopy in the detection of bacteria. En Coonrod JD, Kunz LJ, Ferraro MJ (ed). The direct detection of microorganisms in Clinical Samples. New York 1983; 3-11.
- 103.- Kusumi RK, Grover PJ, Kunin CM. Rapid detection of - pyuria by leukocyte esterase activity . Jama 1981; 245: 1653-1655.
- 104.- Lamb VA, Dalton HP, Wilkins JR. Electrochemical method

- for the early detection of urinary-tract infections.  
Am J Clin Pathol 1976; 66:91-94.
- 105.- Lauer BA, Reller LB, Mirrett S. Comparison of acridine orange and Gram stains for detection of microorganisms in cerebrospinal fluid and other clinical specimens. J Clin Microbiol 1981; 14:201-205.
- 106.- Loo SYT, Scottolini AG, Luangphinith S, Adam AL, Jacobs LD, Mariani AJ. Urine screening strategy employing dipstick analysis and selective culture: an evaluation. Am J Clin Pathol 1984; 81:634-642.
- 107.- Lueiro F, Castaño JL, Amores C. Evaluación de técnicas para la detección de bacteriuria. Rev Esp Microbiol Clin 1986; 1:178-181.
- 108.- McCarthy LR. Evaluation of the MS-2 system for the detection of bacteriuria. En Tilton RC (ed) . Rapid Methods and automation in Microbiology. Washington -/ 1981; 316-320.
- 109.- McCarthy LR, Senne JE. Evaluation of acridine orange stain for detection of microorganisms in blood cultures. J Clin Microbiol 1980; 11:281-285.

- 110.- Mackey JP, Sandys GH. Diagnosis of urinary infections  
B Med J 1966; 2:1173.
- 111.- Maña J, Gaston F, Lonca M, Soriano E, García Sanmi-  
guel J. Meningitis por neumococo moderadamente resis-  
tente a la penicilina: presentación de dos casos y re-  
visión de la literatura. Med Clin 1983; 84:697-699.
- 112.- Maradona JA, López Alonso J, Carton JA, Pérez F, Gar-  
cía Velasco G, Arribas JM. Estudio clínico de bacte-  
riemia por Staphylococcus aureus(SA)en adultos. II Con-  
greso de la Sociedad Española de Enfermedades Infeccio-  
sas y Microbiología Clínica. Palma de Mallorca 26-28 Ma-  
yo 1986.
- 113.- Marco ML, Moles B, Aisa ML, Omeñaca M, Gallegos MC.  
Estudio de la flora aislada en el LCR y/o sangre en en-  
fermos con infecciones del SNC. II Congreso de la So-  
ciedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbio-  
logía Clínica. Palma de Mallorca 26-28 Mayo 1986.
- 114.- Marchiaro G, Serra R. Rapid methods in Microbiology -  
Clin Chemistry Newsletter 1984; 4:50-56.
- 115.- Martín WJ. Rapid methods and instrumentation in the -  
diagnosis of urinary tract infections. Coonrod JD, Kunz

- LJ, Ferraro MJ (ed). The direct detection of Microorganisms in Clinical Samples. New York 1983; 353-357.
- 116.- Martínez Lirola M, de la Rosa M, Peis J, Palop B. Esterasa leucocitaria, nitritos, proteínas y hematies como predictores de infección urinaria. I Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Sevilla 16-19 Mayo 1984.
- 117.- Martínez Luengas F. Bacteriemia en seis Hospitales españoles. Med Clin 1986; 86:221-232.
- 118.- Maskell R, Peard L, Sanderson RA. Fastidious bacteria and the urethral syndrome: A 2-year clinical and bacteriological study of 51 women. Lancet 1983; 2:1277-1280.
- 119.- Matsen JM. Rapid reporting of results-impact on patient, physician and laboratory. En Tilton RC (ed). Rapid methods and automation in Microbiology. ASM - Washington 1981; 98-102.
- 120.- Matsen JM. Relevance of rapid methodologies. en Tilton RC (ed). Rapid methods and automation in Microbiology. ASM Washington 1981; 353-355.

- 121.- Mendez FJ, Pérez F, Alvarez MA, Vázquez F. Bacteriemias por anaerobios en el Hospital Ntra. Sra. de Covadonga de Oviedo (1981-1985). II Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Palma de Mallorca 26-28 Mayo 1986.
- 122.- Mir M, Lloveras J, de las Cuevas X, Masramon J, Aubia J, Orfilia A, Chine M, Girbau J, Llorach M, Salvado M, Torrella T. Infección urinaria por hongos en el trasplante renal. Rev Clin Esp 1985; 176:130-133.
- 123.- Mirrett S, Lauer BA, Miller GA, Reller LB. Comparison of acridine orange, methylene blue, and Gram stains - for blood cultures. J Clin Microbiol 1982; 15:562-566.
- 124.- Moody JA, Fasching CE, Shanholtzer CJ, Gerding DN, Peterson LR. Evaluation of new blood culture processing systems. J Clin Microbiol 1984; 20:351-356.
- 125.- Moore DF, Hamada SS, Marso E, Martín WJ. Rapid identification and antimicrobial susceptibility testing of Gram-negative bacilli from blood cultures by the Automic system. J Clin Microbiol 1981; 13:934-939.
- 126.- Moreno A, Mensa J, Bisbe J, González J, Pumarola T, Jiménez de Anta MT, Martínez JA, Aznar R, Soriano E,

García San Miguel J. Bacteriemia por Salmonella sp (excepto S. typhi) Estudio de 68 casos. II Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Palma de Mallorca 26-28 Mayo 1986.

127.- Mundt KA, Polk BF. Identification of site of urinary tract infections by antibody-coated bacteria assay. Lancet 1979; 2:1172-1174.

128.- Nicolson DP, Koepke JA. The Automicrobic System for urines. J Clin Microbiol 1979; 10:82-833.

129.- Noguero A, Isasia T, Martínez MC, Romero J, Jiménez ML, Rebollar D, López-Brea M. Estudio clínico microbiológico de 200 episodios de septicemia en un Hospital General. II Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Palma de Mallorca 26-28 Mayo 1986.

130.- Noguero A, Martínez MC, Isasia T, Romero J, Fernández Rañada JM, Jiménez ML, López-Brea M. Bacteriemias en enfermos neutropénicos. II Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Palma de Mallorca 26-28 Mayo 1986.

- 131.- Olcen P. Serological methods for rapid diagnosis of -  
Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis and -/  
Streptococcus pneumoniae in cerebrospinal fluid: A -/  
comparison of coagglutination, immunofluorescence and  
immuno-electro-osmophoresis. Scand J Infect Dis 1978;  
10:283-289.
- 132.- Oneson R, Gröschel DHM. Leukocyte esterase activity -  
and nitrite test as a rapid screen for significant bacter  
teriuria. Am J Clin Patol 1985; 83:84-87.
- 133.- Palomares JC. Diagnóstico rápido de la septicemia: tinti  
ción de naranja de acridina. I Congreso de la Sociedad  
Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología /  
Clínica. Sevilla 16-19 Mayo 1984.
- 134.- Parker RH. Application of counterimmuno-electrophoresis  
to the diagnosis of meningitis. En Coonrod, Kunz, Fe-  
rraro (ed). The Direct Detection of microorganisms in  
clinical samples. New York 1983; 97-103.
- 135.- Pedraza MA, Peña P, Jiménez P, Gutiérrez A. Detección  
de microorganismos en sangre: sistema radiométrico. I  
Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecci  
ciosas y Microbiología Clínica. Sevilla 16-19 Mayo -/  
1984.

- 136.- Pedraza MA, Saz JV, Diaz A, Diez M, Velasco AC. Detec  
ción rápida de leucocituria y/o bacteriuria. I Congre  
so de la Sociedad Española de Enfermedades Infeccio-  
sas y Microbiología Clínica. Sevilla 16-19 Mayo 1984.
- 137.- Perea EJ. Métodos rápidos de diagnóstico. En Borobio  
MV, Perea EJ (ed), Métodos de diagnóstico rápido. Se-  
villa 1984; 7-12.
- 138.- Perea EJ. Uretritis no gonocócica y uretritis de etio-  
logía desconocida. Med Clin 1984; 83:849-851.
- 139.- Pérez Belles C, García Aguayo JM, Pérez de León A. Cori  
nebacterias multiresistentes aisladas en hemocultivos.  
II Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades In-  
fecciosas y Microbiología Clínica. Palma de Mallorca  
26-28 Mayo 1986.
- 140.- Pérez Belles C, Santos M, López Hontangas JL, Pardo F,  
Mascaró F, Paz MM. Hemocultivos por el sistema Bactec  
Experiencia de 18 meses. I Congreso de la Sociedad Es  
pañola de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clí  
nica. Sevilla 16-19 Mayo 1984.
- 141.- Pericas R, Coll P, Rabella N. Determinación de la bac-  
teriuria significativa mediante las pruebas de la este

rasa leucocitaria y nitritos. *Enf Infec Microbiol -/ Clin* 1986; 4:45-46.

- 142.- Perry JL, Matthews JN, Weesner DE. Evaluation of leukocyte esterase activity as a rapid screening technique for bacteriuria. *J Clin Microbiol* 1982; 15:852-854.
- 143.- Pezzlo MT, Tan GL, Peterson EM, de la Maza LM. Screening of urine cultures by three automated systems. *J Clin Microbiol* 1982; 15:468-474.
- 144.- Portera A, Franch O. Antibioterapia de las infecciones del sistema nervioso central. En Belmonte A. (ed) *Terapéutica antibiótica*. Madrid 1981; 254-266.
- 145.- Ray CG, Wasilauskas BL, Zabransky R. Laboratory diagnosis of central nervous system infections. McCarthy LR (ed) *Cumitech 14*. Am Soc Microbiol 1982 Washington DC.
- 146.- Refaie ME, Dulake C. Counter-current immunoelectrophoresis for the diagnosis of pneumococcal chest infection. *J Clin Pathol* 1975; 28:801-806.
- 147.- Reik H, Rubin SJ. Evaluation of the buffy-coat smear for rapid detection of bacteremia. *Jama* 1981; 245:357-359.

- 148.- Reller LB. Recent and innovative methods for detection of bacteremia and fungemia. Am J Med 1983; 75:26-30.
- 149.- Reller LB, Murray PR, Maclowry JD. Blood Culture II. Washington II JA (ed) Cumitech 1A. Am Soc Microbiol - Washington DC 1982.
- 150.- Rello J, Gatell JM, Martínez JA, Giménez de Anta MT, Almela M, Andreu J, Soriano E, Pumarola A, García - San Miguel J. Septicemia por *Listeria monocytogenes* en el adulto. II. Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Palma de Mallorca 26-28 Mayo 1986.
- 151.- Richet H, Bayardelle P, Lemarie JC. Rapid detection of bacteriuria by laser nephelometry. J Clin Micro - biol 1984; 19:240-244.
- 152.- Rintala L, Pollock HM. Effects of two blood culture anticoagulants on growth of *Neisseria meningitidis*. J Clin Microbiol 1978; 7:332-336.
- 153.- Roberts GD, Yu PKV, Washington JA. Direct microscopic examination of specimens. En: Washington JA (ed). Laboratory procedures in Clinical Microbiology. New York 1981; 69-89.

- 154.- Rodríguez-Avial C, Martínez P, López O, Gutiérrez M de la Torre F. Cepas de Haemophilus influenzae resistentes a ampicilina y no productoras de betalactamasa Infectologika 1983; 4:11-17.
- 155.- Ruben FL, Norden CW, Korica Y. Pneumococcal bacteremia at a medical surgical Hospital for adults between 1975 and 1980. Am J Med 1984; 77:1091-1094.
- 156.- Saez Nieto JA, Llacer A, Catala F, Fenoll A, Casal J. Meningitis meningocócica en España (1978-1980). I Estudios epidemiológicos, serogrupos y sensibilidad a antimicrobianos. Rev San Hig Pub 1981; 55:831-869.
- 157.- Salventi JF, Davies TA, Randall FI, Witaker S, Waters JR. Effect of blood dilution on recovery of organisms from clinical blood cultures in medium containing sodium polianetholsulfonate. J Clin Microbiol 1979; 9: 248-252.
- 158.- Santini GF. General indications for the choice of -/ automation. Clin Chem Newsletter 1984; 4:60-71.
- 159.- Sanz G, Rafecas FJ, Lorenzo JI, Sanz MA. Bacteriemia por Pseudomonas aeruginosa en pacientes neutrópicos. II Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infec

ciosas y Microbiología Clínica. Palma de Mallorca 26-28 Mayo 1986.

- 160.- Saz JV, Diaz A, Mas G, Diez M, Velasco AC. Diagnóstico de las infecciones del tracto urinario por el AMS (Auto Microbiòc System). I Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica Sevilla 16-19 Mayo 1984.
- 161.- Schaus R. Griess nitrate test in diagnosis of urinary infections. *Jama* 1956; 161:528-529.
- 162.- Serrano García ML, Llosa Dura J, de la Rosa Fraile M. Bacteriemia en un Hospital General. Evaluación de 10273 hemocultivos. *Enf Infec Microbiol Clin* 1985; 3:238-240
- 163.- Sesma Sánchez P, Martínez Deben F, Torres Piñon J, Pia Iglesias G, Llinares Mondejar P, Fernández Pérez J. Bacteriemia en un Hospital Comunitario. Un año de experiencia. *Rev Clin Esp* 1985; 177:57-61.
- 164.- Setia U, Gross PA. Bacteremia in a Community Hospital *Arch Intern Med* 1977; 137:1698-1701.
- 165.- Sherris JC, Ryan KJ. Evaluation of automated and rapid methods. En Tilton RC (ed). *Rapid methods and automa-*

tion in Microbiology. ASM Washington 1981; 1-5.

- 166.- Sicilia T, Aguilera J, Cesar JM, García F, Monzo E, Sentchordi MJ. Presentación de 2152 casos de sepsis meningocócica. I Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Sevilla 16-19 Mayo 1984.
- 167.- Sliva HS, Washington JA. Optimal time for routine early subculture of blood cultures. J Clin Microbiol 1980; 12:445-446.
- 168.- Sonnenwirth AC. Preprototype of an automated microbial detection and identification system: A developmental investigation. J Clin Microbiol 1977; 6:400-405.
- 169.- Smither R. Rapid screening for significant bacteruria using a coulter -counter. J Clin Pathol 1977; 30:158-162.
- 170.- Spencer RC, Philp JR. Effect of previous antimicrobial therapy on bacteriological findings in patients with primary pneumonia. Lancet 1973; 2:349-351.

- 171.- Stam WE. Measurement of pyuria and its relation to bacteriuria. Am J Med 1983; 75:53-58.
- 172.- Suksanong M, Dajani AS. Detection of Haemophilus influenzae type b antigens in body fluids, using specific antibody-coated Staphylococci. J Clin Microbiol 1977; 5:81-85.
- 173.- Sybil AW. Direct identification and susceptibility / testing by the Automicrobic system of Gram negative bacilli from urine specimens. J Clin Microbiol 1986; 23:1068-1071.
- 174.- Tenney JH, Reller RB, Mirret S, Wang WLL, Weinstein MP. Controlled evaluation of the volume of blood cultured in detection of bacteremia and fungemia. J Clin Microbiol 1982; 15:558-562.
- 175.- Thirumoorthy MC, Dajani AS. Comparison of Staphylococcal coagglutination, latex agglutination and counterimmunoelectrophoresis for bacterial antigen detection. J Clin Microbiol 1979; 9:28-32.
- 176.- Thomson RB, Vanzo SJ, Henry NK, Guenther KL, Washington JA. Contamination of cultures processed with the isolator lysis-centrifugation blood culture tube. -/

J Clin Microbiol 1984; 19:97-99.;

- 177.- Thysell H. Evaluation of chemical and microscopical-/  
methods for mass detection of bacteriuria. Acta Med  
Scand 1969; 185:393-400.
- 178.- Tierney BM, Henry NK, Washington II JA. Early detection  
of positive blood cultures by the acridine orange -/  
staining technique. J Clin Microbiol 1983; 18:830-833.
- 179.- Tilton RF, Tilton RC. Automated direct antimicrobial  
susceptibility testing of microscopically screened -  
urine cultures. J Clin Microbiol 1980; 11:157-161.
- 180.- Torne J, García Flores A, Verdaguer A, Morta M, Drobnic  
L. Bacteriemia por Staphylococcus . Estudio prospecti-  
vo de 56 episodios. II Congreso de la Sociedad Españo-  
la de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.  
Palma de Mallorca 26-28 Mayo 1986.
- 181.- Torroba L, Moreno S, Ezpeleta C, Parras F, Dronda F,  
Buzon L. Meningitis por Pseudomonas. II Congreso de la  
Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Micro-  
biología Clínica. Palma de Mallorca 26-28 Mayo 1986.
- 182.- Traub WH, Kleber I. Inactivation of classical and alter

- native pathway-activated bactericidal activity of serum by sodium polyanetholsulfonate. J Clin Microbiol 1977; 5:278-284.
- 183.- Van Esso D. La enfermedad meningocócica en el área del Vallés. Estudio epidemiológico 1981-1985. II Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Palma de Mallorca 26-28 Mayo / 1986.
- 184.- Vega D, Bordes A, Alamo I, Sánchez J, González A. Valoración de tres sistemas de "screening" de orina como filtro previo al uso del UID-3 AMS (Vitek System). II Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Palma de Mallorca 26-28 Mayo 1986.
- 185.- Verger G, Gurgui M. Meningitis bacterianas. Med Clin 1986; 86:632-635.
- 186.- Verhoef J, Jones DM. Pneumococcal antigen in sputum. Lancet 1974; 1:879.
- 187.- Vilaseca Momplet J, Arnau de Bolos JM, Fernández Pérez F, Andreu Domingo A, López Vivancos J, López Hernández A. Bacteriemia por *Aeromonas hydrophila*. Caracte-

rísticas clínicas y bacteriológicas. A propósito de 16 observaciones. Rev Clin Esp 1985; 177:104-107.

- 188.- Villar J, González A, Lafarga B, Alamo I, Medina D, Manzano JL. Incidencia de bacteriemia en pacientes - críticamente enfermos. II Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología - Clínica. Palma de Mallorca 26-28 Mayo 1986.
- 189.- Villasante P, Peña García P, Pérez Pomata M, Ladrón - de Guevara MC. Comparacion de un sistema radiométrico con un sistema de doble fase para hemocultivos. II Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Palma de Mallorca 26-28 Mayo 1986.
- 190.- Wadke M, McDonnell C, Ashton JK. Rapid processing of urine specimens by urine screening and the Automicrobic system. J Clin Microbiol 1982; 16:668-672.
- 191.- Ward JI, Siber GR, Scheifele DW, Smith DH. Rapid diagnosis of Haemophilus influenzae type b infections by latex particle agglutination and counterimmunoelectrophoresis. J Pediatric 1978; 93:37-42.
- 192.- Washington JA II. Blood cultures: principles and tech

niques. Mayo Clin Proc 1975; 50:91-98.

- 193.- Washington JA. Hemocultivos: principios y fundamentos. En Borobio MV, Perea EJ (ed) Septicemia 1985; 9-22
- 194.- Wasilauskas BL, Hampton KD. Determination of bacterial meningitis: a retrospective study of 80 cerebrospinal fluid specimens evaluated by four in vitro methods. J Clin Microbiol 1982; 16:531-535.
- 195.- Webb BJ, Edwards MS, Baker CJ. Comparison of slide coagglutination test and countercurrent immunoelectrophoresis for detection of group B Streptococcal antigen in cerebrospinal fluid from infants with meningitis / J Clin Microbiol 1980; 11:263-265.
- 196.- Weinstein MP, Murphy JR, Reller LB, Lichtenstein KA. The clinical significance of positive blood cultures: a comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. II Clinical observations, with special reference to factors influencing prognosis. Rev Inf Dis 1983; 5:54-71.
- 197.- Weinstein MP, Reller LB, Murphy JR, Lichtenstein KA. The clinical significance of positive blood cultures: a comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. I Clinical observations, with special reference to factors influencing prognosis. Rev Inf Dis 1983; 5:72-81.

- mia and fungemia in adults. I. Laboratory and epidemiologic observations. Rev Inf Dis 1983; 5:35-53.
- 198.- Weiser DL, Emerson JS. Selective screening for quantitative urine cultures. Am J Clin Pathol 1966; 45:649-650.
- 199.- Welch DF, Hensel D. Evaluation of Bactogen and Phadebact for detection of Haemophilus influenzae type b antigen in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol 1982; 16:905-908.
- 200.- Whimbey E, Wong B, Kiehn TE, Armstrong D. Clinical correlations of serial quantitative blood cultures determined by lysis-centrifugation in patients with persistent septicemia. J Clin Microbiol 1984;19:766-771.
- 201.- Whittle HC, Greenwood BM, Davidson NMCD, Tomkins A, Tugwell P, Warrell DA, Zalin A, Bryceson ADM, Parry EHO, Brueton M, Duggan M, Domen JMV, Rajkovic AD. Meningococcal antigen in diagnosis and treatment of group A meningococcal infections. Am J Med 1975; 58:823-828.
- 202.- Whittle HC, Tugwell P, Egler LJ, Greenwood BM. Rapid bacteriological diagnosis of pyogenic meningitis by latex agglutination. Lancet 1974; 2:619-621.