

Análisis de la orina

Objetivos:

1. Aprender sobre microorganismos que pueden estar asociados a infecciones urinarias.
2. Aislar bacterias asociadas a la orina.
3. Realizar pruebas bioquímicas para una posible identificación de las bacterias aisladas de la orina.

El sistema urinario tiene estructuras que pueden estar contaminadas por microorganismo como es la genitales y la parte baja de la uretra. Sin embargo las otras partes del sistema urinario como la vejiga, uréter, riñones son estériles al igual que la orina. Hay microorganismos que pueden acceso estas otras estructuras y ocasionar una infección entre ellos bacterias Gram positivas, bacterias Gram negativas, virus, hongos y parásitos. Las infecciones en el tracto urinario pueden afectar solo una estructura del sistema como diseminarse por todo el sistema.

Algunos microorganismos que pueden afectar el sistema urinario

Especie	Tipo de microorganismo
<i>Candida albicans</i>	levadura
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Protozoa
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bacteria
<i>Enterococcus faecalis</i>	Bacteria
<i>Schistosoma haematobium</i>	Helminthes
<i>Escherichia coli</i>	Bacteria
<i>Proteus vulgaris</i>	Bacteria

Información tomada de: Microbiology: A laboratory manual, 4ta ed.

Las infecciones del tracto urinario (UTI, siglas en inglés) es cuando una de las estructura ya sea uretra, uréter, riñones o vejiga ha sido afectada. Las mujeres en comparación a los hombres tiene mayor riesgo de sufrir una infección del tracto urinario. Las UTI pueden ser más comunes en mujeres por: 1) la anatomía del cuerpo ya que la uretra es más corta y las bacterias pueden acceso a la vejiga; 2) tipo de control de natalidad, los diafragmas promueven más infecciones como los espermicida., 3) menopausia, la baja de estrógenos puede causar cambios haciendo más vulnerable. También personas con anomalías en su tracto urinario, con problemas de piedras en el riñón, sistema inmunológico suprimido, utiliza catéter pueden tener riesgo de UTI.

Algunas UTI pueden ser asintomáticas pero en cuando son reflejadas con síntomas estos pueden ser: urgencia para orinar, sensación de quemadura cuando orinas, ir a orinar frecuentemente, orina turbia, orina con color rosado, rojo o color cola, olor fuerte, dolor en la pelvis. Hay algunos síntomas que ayudan a conocer que área del tracto urinario está infectado. Por ejemplo, cuando una persona tiene pielonefritis aguda (infección en los riñones) puede tener fiebre, vómitos, náuseas, escalofríos y dolor la parte baja de la espalda. Por otro lado, presión en la pelvis, molestia en la parte baja del abdomen, orina con sangre y al orina duele, entonces puede ser una cistitis (infección en la vejiga).

Se realiza una examinación de la muestra de orina para verificar si hay una infección en el tracto urinario. Esta muestra se colecta en envase estéril luego de realizar una limpieza de los genitales para reducir la contaminación. Se recomienda al paciente que haga la colecta de la primera orina de la mañana, que descarte la primera orina que sale de la uretra para limpiar el ducto y colecte el restante de la orina que se encuentra en su vejiga. Esta muestra se debe procesar fresca, sin embargo se pueden almacenar a 2-8 grados hasta por 24 horas. También se pueden usar tubos con preservativos para almacenar. En algunos casos la muestra es tomada usando un aspirador o un catéter que se conduce directamente a la vejiga.

La muestra es procesada para llevar a cabo un examen cuantitativo y poder determinar cuántos microorganismos por mL contiene la orina. Si los resultados son exceden 10^5 CFU (100,000) por ml quiere decir que hay una infección (bacteriuria). Un conteo de 0-1,000 por mL es un resultado normal ya que puede ser contaminación en la colecta de muestra. Si el conteo sale entre 10^3 - 10^5 CFU/mL (1,000-100,000) se recomienda repetir el examen. Sin embargo cuando la muestra es obtenida por aspiración directa de la vejiga, entonces es un resultado positivo para UTI. Para detectar el patógeno, se inocula muestra de la orina usando aguja de inocular calibradas en medios selectivos y diferenciales. Al usar la aguja inocular calibrada permite aislar y cuantificar. Este procedimiento se hace una línea recta en el centro del plato Petri que ayuda a deducir que si $\frac{3}{4}$ de la línea recta tiene crecimiento bacteriano es que hay más de 10^5 CFU (100,000) por ml. Además, en el mismo plato se hace inoculación con otra aguja en forma de zig-zag cruzando sobre la línea central que permite aislar colonias de los posibles patógenos. Algunos de los medios selectivos y diferenciales que se usan son agar de sangre, agar de chocolate, “manitol salt agar” y agar MacConkey.

I. Practica:

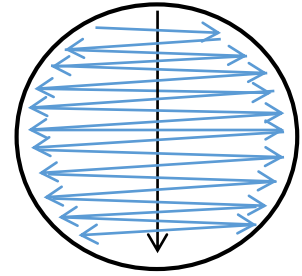
A. Descripción de la apariencia de la orina

Características	
Color	
Olor	
Turbidez	
pH	
Otras observaciones	

B. Aislar microorganismos de la orina en TSA

1. Limpie el área de trabajo con desinfectante y lleve a cabo las técnicas asépticas aprendidas en microbiología general.
2. Rotule el anverso del plato Petri de TSA con iniciales, fecha, Biol 4375L sección.
3. Tome una muestra de orina usando la aguja de inocular calibrada (10 μ l). Sumerja solo la parte del “loop” de forma recta para evitar traer mayor volumen de lo requerido.

4. Realice una línea recta en el centro del plato.
5. Luego esparza la muestra con otra aguja de inocular calibrada haciendo zig-zag por todo el plato.
6. Coloque parafina al plato e incuba a 37°C por 24-48 horas hasta que vea crecimiento bacteriano para aislar.
7. Luego, seleccione una colonia y aísle en un tubo inclinado de “Tryptic Soy Agar” (TSA). Guarde el plato de TSA en la nevera e incubar el tubo a 37°C por 24-48 horas. Guarde el tubo de TSA en la nevera luego de observar bastante crecimiento del desconocido.
8. Anote las observaciones de apariencia de las colonias, color de las mismas y tome fotos del plato. Cuento cuantas colonias crecieron para realizar el cálculo de CFU.



colonias X factor que convierte 0.01 ml a 1ml = CFU/ml

30 colonias X 100 = 3,000 CFU/ml

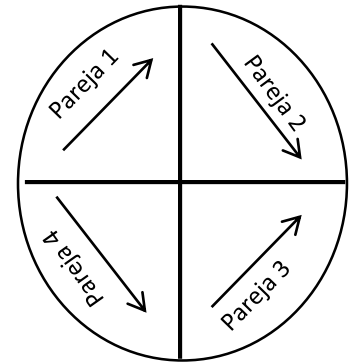
B. Centrifugación y observación de la orina bajo el microscopio

1. Transferir 10 ml de la muestra orina a un tubo cónico.
2. Centrifugar por 3-5 minutos en baja revolución (1500rpm) para evitar lisis de las células y particulados que se encuentran en la orina.
3. Descartar el sobrenadante (9.5ml) con cuidado en el vaso de colecta de orina.
4. Introducir una pipeta Pasteur para resuspender el contenido del tubo y tome un poco de la orina del fondo del tubo.
5. Colocar 1 gota en una laminilla y poner un cubreobjeto.
6. Observar bajo el microscopio y anotar lo observado en 5 campos visuales usando el objetivo 40X y 5 campos visuales con el objetivo 100X.
7. Tome foto de lo observado para reportar en su libreta e informe.

C. Pruebas para identificar el desconocido que se realizará en el próximo laboratorio.

1. **Tinción Gram:** ya discutida y practicada en el primer laboratorio. Seguir las instrucciones de esa separata.
2. **Manitol Salt Agar (MSA):** Es un medio selectivo, ya que tiene componentes que inhibe el crecimiento de un grupo de bacterias y diferencial por tener compuestos que permite ver diferencia entre bacterias relacionadas. El componente que lo hace selectivo es el 7.5% de NaCl que inhibe el crecimiento de algunas bacterias. La azúcar manitol es el compuesto que promueve diferencial entre especies de *Staphylococcus* ya que algunas pueden fermentar manitol y otras no. El indicador de cambio de pH por la fermentación de manitol es el rojo fenol que imparte un color rojo fusha al medio y cambia a amarillo al bajar el pH.

- a. Por el anverso del plato Petri MSA, divida en 4 áreas el plato para que 4 parejas de estudiantes inoculen su desconocido. Así que será 1 plato Petri MSA por mesa. En cada área designada para una pareja debe estar rotulada con las iniciales de la misma. El plato debe estar rotulado con Biol 4375L y sección.
- b. Inocule su desconocido en una porción del plato haciendo una línea recta. Selle el plato con parafina.
- c. Incube el plato invertido a 37°C por 24-48 horas y anote observaciones de cambio de color y crecimiento de la bacteria en el medio en su libreta. Tome foto.



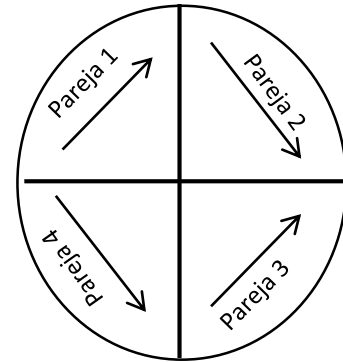
3. **Esculina biliar:** Ayuda a identificar el grupo D de estreptococos que son los enterococos. Estos hidrolizan la esculina en presencia de sales biliares rompiendo la esculina en glucosa y esculetina. El medio cambia a un color oscuro por las sales de hierro que se producen por la interacción de esculetina y el hierro, haciendo un resultado positivo para la prueba. La prueba es negativa si no ocurre el cambio de color a oscuro por completo en 24-48 horas.

- a. Rotule el tubo del medio de esculina biliar usando un pedazo de cinta adhesiva y coloque iniciales, fecha, Biol 4375L sección.
- b. Usando las técnicas asépticas, inocule el desconocido en el tubo de agar inclinado haciendo zig-zag en la superficie inclinada.
- c. Incube a 37°C por 24-48 horas.
- d. Anote las observaciones en la libreta a las 24 y 48 horas sobre cambio de color y tome foto.

4. **“Triple Sugar Iron Agar” (TSIA):** A través de este medio se puede observar si la bacteria utiliza las azúcares: glucosa, lactosa y sacarosa y produce sulfitos. La razón de las azúcares está: 1% lactosa, 1% sacarosa y 0.1% glucosa. El medio tiene rojo fenol como indicador de cambios de pH para detectar la producción de ácido por la fermentación de las azúcares. Esta prueba se inocula con la aguja recta haciendo un zig-zag en la parte inclinada del agar y un estocado hasta el fondo del tubo. Se puede observar varios patrones de color a causa de la fermentación, formación de gas agrietándose el medio y producción de H₂S que hace que el medio se torne negro en el fondo.

- d. Rotule el tubo con iniciales, fecha, Biol 4375L sección.
- e. Inocule en forma de zig-zag la bacteria usando una aguja recta y luego un estocado hasta el fondo del tubo. Recuerde llevar a cabo las técnicas asépticas.
- f. Incubar por a 37°C por 24 horas.
- g. Observe si hay cambio de color del medio. Tome foto y anote observaciones de los patrones de cambio de color en su libreta. Corrobore si el medio se agrietó por formación de gas y si se tornó negro en el fondo por la producción de H₂S.
- h. Descarte el tubo en la gradilla para descartar luego de haber removido la cinta adhesiva del tubo.

5. Agar Mac Conkey: Este medio es selectivo y diferencial que permite aislar bacterias Gram negativo. El medio contiene cristal violeta que inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas. Además, tiene lactosa, sales biliares que ayuda a discernir entre las Gram negativas fermentadoras de lactosas. Contiene el indicador de cambios de pH rojo neutral. Las bacterias fermentadoras de lactosa se observan como colonias fushas- rojas al igual que el alrededor de la colonia. Las bacterias o fermentadoras de lactosa se observan incoloras.



- Limpie el área de trabajo con desinfectante y lleve a cabo las técnicas asépticas aprendidas en microbiología general.
- Rotule el anverso del plato Petri de MacConkey con iniciales, fecha, Biol 4375L sección. Divida el plato en 4 zonas para poder inocular a través de una línea recta su desconocido en uno de los cuadrantes. Se va usar un plato para 4 desconocidos.
- Coloque parafina al plato e incuba a 37°C por 24-48 horas hasta que vea crecimiento bacteriano. Corrobore si la bacteria utiliza lactosa.
- Anote las observaciones de apariencia de las colonias, color de las mismas y tome fotos del plato.

6. Prueba de ureasa: Esta prueba permite verificar si la bacteria tiene la capacidad de producir la enzima ureasa que rompe la urea en armonía agua y dióxido de carbono. El medio es líquido y contiene el indicador de cambios de pH rojo fenol. Al hidrolizarse la urea se produce armonía que aumenta el pH en el medio y ocasiona un cambio de color de rojizo a rosa intenso. Este cambio de color es un resultado positivo para la prueba.

- Rotule el tubo con iniciales, fecha, Biol 4375L sección.
- Inocule usando una aguja de inocular “loop”. Recuerde llevar a cabo las técnicas asépticas.
- Incubar por a 37°C por 24-48 horas.
- Observe si hay cambio de color del medio. Tome foto y anote observaciones del cambio de color en su libreta.
- Descarte el tubo en la gradilla para descartar luego de haber removido la cinta adhesiva del tubo.

7. Catalasa: Enzima que degrada H₂O₂ (peróxido) en agua y oxígeno. El peróxido puede ser tóxico para las células incluyendo a las bacterias. Ayuda a diferencias bacterias de los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus*.

- Al finalizar de realizar las transferencias de su desconocido a las diferentes pruebas, añada unas gotas de peróxido 3% al tubo del desconocido.
- Observar si crea burbujas que es indicativo de un resultado positivo a la prueba.
- Anotar resultado en la tabla de su libreta y tome foto.

Referencias

Cappuccino, J.G. & Sherman, N. (1996). *Microbiology: a laboratory manual (4^{ta} ed.)*. Menlo Park, California: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.

Howrad, B.J., Klaas, J., Rubin, S.J., Weissfeld, A.S & Tilton, R.C. (1987). *Clinical and pathogenic microbiology*. St. Louis, Missouri: The C.V. Mosby Company.

Mayo Foundation for Medical Education and Research. (2018). *Urinary tract infections (UTI)*. Recuperado de: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/urinary-tract-infection/symptoms-causes/syc-20353447>.

Norell, S.A. (1985). *Laboratory text in introductory microbiology for health sciences students*. Englewoods cliffs, NJ: Prentice-Hall, Inc.