

# CUANTIFICACION DE BACTERIAS EN LA ORINA

JOSE ANTONIO ARANA SIALER \*\*

## INTRODUCCION

Siguiendo el plan trazado en el Laboratorio de Investigaciones de la Cátedra de Clínica Médica del Hospital "Arzobispo Loayza", para el estudio de las Infecciones Urinarias, se vió la necesidad de utilizar una técnica cuantitativa de bacterias en la orina que nos permitiese evaluar en forma más exacta la positividad de un cultivo de orina.

A comienzos de 1956, orientados por el trabajo Sanford (96) y Jawetz 52) comenzamos a utilizar el método de la placa vertida (pour plate) en dichas determinaciones. La experiencia lograda en 8 meses de aplicación de esta técnica, nos permitió establecer que ésta no era todo lo exacta que el método requería, y que era de imperiosa necesidad el estudio de una nueva técnica de cuantificación. La revisión cuidadosa que efectuamos sobre los métodos que se utilizaban en la cuantificación de bacterias, nos permitió seleccionar el método del plaqueado recomendado por Snyder (104) y Crone (26) con el fin de llevar a cabo su experimentación y aplicarlo en la cuantificación de bacterias en la orina.

El presente trabajo tiene como finalidad establecer una nueva sistemática de estudio en la cuantificación de bacterias en la orina y de subrayar la importancia de su aplicación a la clínica.

---

\* Trabajo del Laboratorio de Investigaciones de la Cátedra de Clínica Médica.—

\*\* El autor expresa su agradecimiento a sus padres, al Prof. Dr. Héctor Colichón, al Dr. Carlos Monge Cassinelli, así como a la Srta. Sonia Burnstein y Srs.: N. Domínguez y B. Sánchez por su ayuda técnica y a la Sra. Cristina Duarte de Morales y Srta. Deidamia Cortez, Directora y Asistente de la Biblioteca de la Facultad.

## CAPITULO I

## A.—CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LA CUANTIFICACION DE BACTERIAS

Los métodos usados en la cuantificación de bacterias han sido clasificados en:

- A) Directos; y
- B) Indirectos.

## A) METODOS DIRECTOS

Llamados también cuenta total o determinación microscópica, determinan el número total de organismos vivos o muertos contenidos en la solución total y generalmente se realizan empleando la observación microscópica.

## B) METODOS INDIRECTOS

Llamados también cuenta viable, determinan el número de bacterias que son capaces de desarrollar en medios apropiados, sean de naturaleza líquida (método de dilución) o sólidos (método de plaqueado).

Con el fin de tener una idea general de los métodos haremos una breve descripción de sus más importantes modificaciones, tratando de establecer su exactitud individual y la discrepancia establecida entre ellos.

## A) CUENTA TOTAL

LA CUENTA TOTAL COMPRENDE LOS SIGUIENTES METODOS:

- a) Cuenta directa microscópica de una preparación teñida sobre un portaobjeto.
- b) Método de Wright.
- c) Examen microscópico de los organismos en una cámara de cuenta.

a) Consiste la técnica en colocar una azada de la solución - problema sobre un portaobjetos. Enseguida, la lámina es fijada, teñida y observada bajo el microscopio.

El número de organismos se determina por el número de campos obtenidos y la cantidad de microorganismos de cada campo.

Esta técnica descrita por primera vez según Topley (109) por Eberle en 1896 y según Wilson (113) por Klei en 1900; está sometida a una serie de variaciones dependientes de los factores de error: de tinción Anderson (3) 1920, Levine (67); de la capacidad de los gérmenes para absorber los colorantes, así como de otros factores secundarios que hacen insegura su utilización.

#### METODO DE WRIGHT

Consiste en mezclar, un volumen de suspensión bacteriana, con un volumen de sangre humana normal, la que se extiende sobre una lámina portaobjeto, que secada y teñida se examina al microscopio contando el número de bacterias y glóbulos rojos presentes en un número determinado de campo y correlacionando el número de hematies encontrados (del que siempre se conoce su cifra normal) con el número de bacterias que pueden existir en la suspensión normal. Esta técnica ha sufrido hasta el momento poca modificación y es una de las técnicas de observación más inseguras.

#### EXAMEN MICROSCOPICO DE LOS ORGANISMOS EN UNA CAMARA DE CUENTA

Puede efectuarse con un hematómetro corriente, pero es mejor el empleo de cámaras especiales como la empleada por Wilson Kullmann (116) tipo Thoma-Zeiss; la empleada por Knoysi (62) tipo Petroff Hauser, y la más corrientemente usada (14; 16; 41; 113; 54) de Helber.

Los organismos son examinados sin teñirlos, sirviéndose de la iluminación sobre campo oscuro para lo cual se utiliza un condensador especial. Este método, sobre todo el de la cámara de Helbar, tiene la ventaja de que su factor de error es constante, el que ha sido estudiado por Glynn (41), Wilson (113) y Jennison (54), con un coeficiente de variación de más o menos 10%.

## B) CUENTA VIABLE

- Comprende: 1º Método de la dilución.  
2º Método del plaqueado.

### 1º METODO DE LA DILUCION

Consiste en diluir el material a examinarse generalmente en series al décimo, inoculando estas diferentes diluciones, en un número apropiado de tubos con medio líquido; si el desarrollo ocurre cuando se ha inoculado un centímetro de la dilución de 1/100, no así en la dilución al 1/1000, el número de bacterias estaría comprendido entre 100 y 1000. El método en general es bastante preciso; su desventaja consiste en calcular el número de bacterias presentes en las diferentes diluciones que se han realizado y en determinar el número de tubos que debe usarse para cada dilución, dificultades que han sido obviadas mediante la tabla dada por McCrady en 1915 (82) y Wollmann (117), la que ha sido completada por las ecuaciones estadísticas de Ziegler y Halvorson (122).

### 2º METODO DEL PLAQUEADO

Se usa corrientemente en las determinaciones cuantitativas de bacterias; está basado en la suposición de que cada célula o agregado de células es capaz de producir una colonia sobre medios apropiados; en general presenta muy poca diferencia con respecto al descrito originalmente por Koch en 1887. Las consideraciones sobre los diferentes factores de error que el método tiene los describiremos en un capítulo aparte. Presentamos aquí una breve descripción de sus principales modificaciones:

#### a) PLACA VERTIDO (POUR-PLATE)

Un volumen determinado de la suspensión original es colocado en placas de Petri estériles, en las que se vierte apropiada cantidad de medio líquido y mantenido a una temperatura de 45º tratando de realizar la mezcla por inclinación o movimiento rotatorio de las placas, las que se dejan solidificar por un tiempo prudencial antes de incubarlo.

### b) TUBO ROTADO (ROLL-TUBE)

En tubos estériles de 16 por 150 mm. se hace una mezcla de inóculo con 2 cc. de medio líquido y mantenido a 45°C. Dichos tubos son rotados con la mano con el fin de realizar una mezcla uniforme de las bacterias con el medio. La rotación se hace en posición horizontal de tal manera que el medio se distribuya sobre la mitad de las paredes del tubo. Al producirse la solidificación los tubos son incubados en posición invertida.

### c) PLACA EN SUPERFICIE INOCULADA POR GOTEO

Las alíquotas de las suspensiones en vez de ser mezclados con el agar fundido como han sido descritas en los métodos a y b, son distribuidas con pipetas calibradas sobre la superficie de placas previamente repartidas y en las cuales el control de la esterilidad es llevado a cabo por una incubación variable entre 24 horas (Crone) (26) y de 3 a 5 días (Snyder) (104) antes de su utilización. La extensión del inóculo se hace por inclinación de la placa.

### d) PLACA EN SUPERFICIE DISTRIBUIDA CON UNA BAGUETA

Un décimo de centímetro cúbico de las suspensiones a utilizar se vierte sobre la superficie de las placas en condición similar al método c; la diferencia con este método consiste en que el inóculo es distribuido mediante el empleo de una bagueta de vidrio de borde romo.

Las tres últimas modificaciones son las más corrientemente usadas, encontrando en la literatura, que el método de la placa vertida (pour plate) ha resultado ser el más frecuentemente elegido por los autores que han desarrollado la cuantificación de bacterias en la orina como Marple (77), Linneweh (68), Sanford (96), Koss (57), Philpot (90a); pero, este método tiene la desventaja de utilizar el medio licuado que para su uso debe ser mantenido a 45°C. El control de esta temperatura muchas veces no es posible, pudiendo tener efectos significativos sobre la viabilidad de las bacterias como lo ha establecido Sherman (100) (101), discrepando en este sentido Wilson (113) quien al analizar este factor observa que, al agar fundido puede permitirse las variaciones entre 41° y 50° sin sufrir efectos deletéreos. Snyder:

(104), al señalar las diferencias significativas entre los cuatro métodos, considera más prudente no someter este método a las comparaciones estadísticas, las variaciones del factor citado las hace inaplicables.

Con respecto al uso del tubo rotado (método b) y los métodos de la placa en superficie (métodos c y d) hay discrepancia entre los autores, dependiente de los grados comparativos de exactitud y de las ventajas técnicas del procedimiento. Wilson (113) comparó bajo las mismas condiciones ambos métodos, concluyendo por recomendar el empleo del tubo rotado por las enormes ventajas que se obtenían sobre el método de la placa;

- a) Economía de materiales, tanto de placas como de medio;
- b) Menor grado de contaminación (ya que no es necesario el control previo como en el de las placas);
- c) Facilidad de su manejo.

Snyder (104) acepta las dos primeras razones discrepando en la última, ya que considera más tedioso el contaje de las bacterias en el tubo; sólo los recomienda cuando las razones de economía y falta de espacio en la estufa lo requieran; ambos autores y (90) (93) encuentran siempre cantidades más altas en el método del tubo rotado, tal vez en relación con la cantidad de gérmenes que pueden quedarse en la bagueta, pero no hay diferencias sustanciales con respecto a la exactitud (79).

En cuanto a las discrepancias señalados entre la cuenta total y viable, los autores están de acuerdo en asignar un mayor número de bacterias a la cuenta total (41) (122) (62) aún cuando ésta ha sido estudiada en el período logarítmico de desarrollo (54) (113) (3). Varios son los factores que dan esta diferencia pudiéndose señalar los siguientes:

a) **La presencia de grumos** (clumping).—Glynn (41) al analizar sus diferencias, que fueron entre el 5 al 30%, estableció este factor de agrupación de las bacterias que fué posteriormente señalado por Knaysi (62) y Wilson (113) Jenninson (54), trabajando con *Echerichae Coli* en la fase logarítmica y después de descartar otros factores, afirmó concretamente que este es el factor responsable de los diferencias; sin embargo, al lado de estos factores, Ziegler (122), demostró que mediante una buena agitación podrían desaparecer los grumos en la solución no encontrando una marcada diferencia entre ambas determinaciones.

b) **Variación en la resistencia de la célula.**—Para unos la resistencia depende de la naturaleza intrínseca de la célula, y para otros de factores extrínsecos como es el proceso de manipulación, pues, muchos gérmenes pueden morir por efecto del plaqueado (100), por la temperatura (102), y por las condiciones de los medios (6).

## CAPITULO II

### METODO DEL PLAQUEADO

La técnica del plaqueado constituye en la actualidad el método electivo para realizar la cuantificación de bacterias (104) (26). Varias razones apoyan esta aseveración.

1° Los grados de precisión que se pueden alcanzar cuando son estimados todos los factores de error.

2° La facilidad que presenta su manipulación que hace aplicable el método sobre todo a los objetivos biológicos.

La literatura ha establecido amplias variaciones para este método aún bajo las mejores condiciones de trabajo, pero que son evaluables estadísticamente. Para Wright y Thornton (117a) los coeficientes de variación son de 32%; para Ziegler y Halvorson de 30% (122), para Mudge y Lawler (81) de 25%; al lado de otros valores altos. Jenninson (54) encuentra valores tan bajos como de 4%; encontrándose numerosos valores intermedios entre estas amplias variaciones.

Con el fin de interpretar estas variaciones analizamos los valores de error señalados dispersamente en la literatura y que han sido enfocados parcialmente por trabajos tan completos como los de Wilson (113) y Snyder (104).

### FACTORES DE ERROR

A) **Presencia de "grumos" o "clumping".**—Al analizar las diluciones de la suspensión original se encuentra siempre la presencia de "grumos" o "clumping" de bacterias, resultado de la incompleta separación después de la fisión, que parece depender del tipo de bac-

teria (Kelly) (60) así, el género *Rhizobia* es el que mayores dificultades ha presentado (Wilson y Kulmann) (116).

Estos "grumos" o "clumping", para algunos autores (Ziegler (122) y (48) se logran separar mediante una adecuada agitación, pero para otros (Jenninson) (54) y Knaysi (62) esta manipulación es insuficiente habiéndose observado que generalmente están compuestos por dos células la mayoría. Su presencia, para Jenninson sobre todo, es el factor fundamental para explicar las discrepancias señaladas entre la cuenta total y viable, mientras que para otros, comparte su importancia con otros factores observados. En general, este factor parece depender del cuidado de la técnica y tiene un aporte limitado al error total, como lo demuestra Snyder (104).

**B) Error en la preparación de las diluciones y características de la pipeta utilizada.**—La literatura considera (55) (113) (104) que es insignificante su aporte al error total dependiendo del manejo técnico, habiendo establecido Snyder (104b) en 1940 ecuaciones estadísticas que permiten su cálculo.

**C) Error en la distribución de las alíquotas en la suspensión.**—Este es uno de los factores de error que mayores esfuerzos ha demandado a los investigadores: Fisher (35), James y Sutherland (51). Sutherland y James (108) sostienen que bajo condiciones ideales pueden seguir las variaciones de la ley exponencial de Poisson, y, en general, los autores (Wilson y Kulman) (116) sugieren que sólo es posible disminuir la variabilidad de este factor aumentando el número de placas repicadas. De la misma opinión es Snyder (104) quien llevando a cabo una minuciosa evaluación de cinco de los factores de error (A) (B) (D) (E), observa que el error en la distribución de las alíquotas constituye la mayor parte del error total, recomendando que cuanto mayor esfuerzo se emplee para tratar de aumentar su grado de precisión se reducirá el error total. Esto se puede lograr inoculando el mayor número de placas que las condiciones del experimento lo permita. Snyder observa que el error standard de las placas repicadas es inversamente proporcional a la raíz cuadrada del número de placas utilizadas, señalando que cualquiera que sea el error obtenido con tres placas por grupo, el error obtenido con el empleo de doce placas es reducido a la mitad y con el empleo de veintisiete a los  $2/3$ .



**D) Error de la medida de las alíquotas al ser colocadas en el medio.**—Es el error obtenido al dejar caer las alíquotas sobre la superficie de los medios; este factor ha sido relacionado por Wilson (113) y Miles (79) al grado de precisión del pipeteo encontrando que es de poco valor. Snyder (104) determinó este error calculando la variabilidad observada por tres tipos de pipeta mediante el método gravimétrico, observando pequeñas variaciones, siendo mayor cuando se empleaba 0.1 cc. de alíquota (c.v. de 0.2727 %) y menores cuando se empleaba 0.9 cc. de alíquota (c. v. de 0.0098 %). Al relacionarlas al error total encontró que este factor es insignificante.

**E) Factores de desarrollo de las bacterias que pueden impedir su visualización.**—Estos factores dependen de la distribución de las bacterias en los medios usados y de las condiciones de desarrollo que ellos pueden ofrecer. Han sido analizados por McNew (78) quien demostró que el concepto teórico de una bacteria da origen a una colonia, se cumple sólo en el 95% de la población bacteriana, pues grumos o agregados de células pueden también dar origen a una colonia; otro hecho relacionado con estos factores, es que existe una proporción de gérmenes viables que por las condiciones del medio no pueden ser visualizados en forma de colonia. Harmseel (44), contemplando este aspecto, basado en la ley exponencial de Poisson logra determinarlos; este mismo factor de la visualización de las colonias ha sido señalado (26) como una desventaja que presentan los métodos del tubo rotado y de la placa vertida que no pueden utilizar medios opacos. El porcentaje de error que este factor dá al error total, tiene para Snyder (104) segunda importancia después del error de distribución de las alíquotas y es bastante difícil disminuir su variabilidad.

**F) Medios de cultivo.**—Las condiciones que los medios de cultivo ofrecen para el desarrollo de las bacterias es un factor de tenerse en cuenta. Para algunos autores estas condiciones dependen de la composición de ellos, así Probisher (36) observa que cuanto más nutritivo es un medio, se obtienen cuantificaciones más altas. Ayers (6) compara diferentes concentraciones de Agar encontrando diferencias; para otros autores (22) (1) esto depende del pH. Esta variabilidad que depende del factor medio de cultivo hace recomendar a Fisher (35) que cuando se hagan comparaciones estadísticas se tenga en cuenta la variación de los stock de medios; al lado de estas afirmaciones, Norton y

Seymour (85), al no observar variaciones apreciables cuando comparan cinco diferentes medios, concluyen que este factor es debido más a los errores de la técnica de cuantificación que a los inherentes a la composición de los medios.

**G) Número de placas empleado.**—Cuanto mayor sea el número de placas permitido a cada experimentador sin que signifique pérdida de material y tiempo es mucho mejor, ya que, como hemos analizado en el factor C, disminuye el factor de error total; varias fórmulas (53) (62) (104) (113), han sido propuestas con el fin de establecer el límite inferior aceptable y casi todos coinciden en recomendar un mínimo de 5 placas para cada dilución. Quizás en este sentido, la fórmula propuesta por Wilson y Kullmann (116) resulte la más práctica; este autor, recomienda hacer determinaciones en 4 placas y al hacer el recuento de colonias, eliminar la que decididamente se aleje de las restantes; las variaciones encontradas en las otras tres, sólo dependerá del factor "chance" y el error es permisible.

**H) Factor de error del diluyente.**—Es evidente la acción de los diluyentes empleados sobre la viabilidad de los gérmenes. Aún en períodos cortos de exposición han sido señaladas marcadas diferencias para las distintas soluciones acuosas empleadas. Wilson (113), demostró cómo el agua destilada tiene una acción deletérea progresiva sobre la *Salmonella suispestifer*, observando cómo las suspensiones de bacterias eran esterilizadas a las 18 hrs. y al hacer comparaciones de tres diferentes diluyentes: Solución de Ringer, agua de caño y solución salina, demostró que la solución de Ringer era la de menor efecto; que la solución salina la de efectos más pronunciados y que el agua de caño tenía una posición intermedia.

Cohen (22) cree que las acciones bactericidas de los diluyentes está en la concentración de hidrogeniones que éstos pueden tener, lo que ha sido confirmado por Butterfield (18) quien, comparando soluciones a diferente pH, comprobó que las soluciones a pH alcalino (8.2 a 9) y soluciones a pH ácido, menores de 5.5 tenían un efecto claramente bactericida. Wilslow (115), señala que este efecto de los diluyentes está en razón directa de la edad de los cultivos, siendo los cultivos más jóvenes los más sensibles. Jenninson (54), trabajando con agua destilada a 22° confirma este mismo efecto. En general, todos los autores (113) (23) (104) que han evaluado los factores de error en la

cuantificación de bacterias, han insistido en determinar el factor de error que su propio diluyente presentaba y de esta evaluación total se concluye que el mejor diluyente es el que tiene la solución bufferado a pH 7.

I) **Número de colonias por placa o tubo.**—El número de colonias desarrolladas en las placas o tubos presentan muchas veces algunas dificultades para su cuantificación; unas veces dependientes del sobreagrupamiento de las colonias por la mala distribución de ellas, sobre todo cuando se emplea la técnica de la placa vertida dejando de lado el método de distribución del inóculo por bagueta o cuando se produce un excesivo desarrollo de bacterias. Varios autores (15) (113), han contemplado este último factor, señalando que el número límite de bacterias que es permitido cuantificar sin grandes variaciones de error está entre 40 y 200 (15) y entre 100 y 200 (113).

J) **Factor de error de la temperatura.**—Este factor ha sido considerado en dos aspectos: en relación a los efectos que la temperatura de los medios líquidos tiene sobre la viabilidad de las bacterias (102) (1) y respecto de la variación que pueden presentar las estufas (54) (113) (104) donde son incubadas las placas y tubos.

### CAPITULO III

#### PARTE EXPERIMENTAL:

##### A) **Experimentación con el método de plaqueado:**

Con el fin de determinar el método de cuantificaciones de bacterias que fuese fácilmente aplicable a las cuantificaciones de orina, con un mínimo de factor de error, seleccionamos el método en superficie de placas con distribución del inóculo por bagueta (método "b" de Snyder). Fué nuestro propósito repetir series experimentales bajo las mismas condiciones que señala el autor para establecer nuestros propios factores de error.

## MATERIALES Y METODOS

Cultivo: se usó una cepa de *Escherichae coli* procedente de una infección urinaria.

Pipetas serológicas, graduadas de 1 cc. (Esax) con un error del 1%.

Fiolas (Esax) de 100 cc. con un error de 0.6%.

Placas Petri de 10 cc. de diámetro.

Tapones de jebe.

Baguetas de vidrio con borde romo.

Diluyente:

Gelatina . . . . .	2	grs.
Fosfato disódico . . . . .	10	grs.
(12 H <sub>2</sub> O)		
Agua destilada . . . . .	1000	cc.
pH 7		

Medio:

Triptone . . . . .	20	grs.
Cloruro sódico . . . . .	5	grs.
Glucosa . . . . .	5	grs.
Agar . . . . .	20	grs.
Agua destilada . . . . .	1000	cc.
pH 6.8		

## METODO

Una décima de un cultivo de *Escherichae coli*, desarrollado durante 24 horas en caldo Brain Hearth infusión, se colocó en una fiola estéril o la que se agregó el diluyente hasta el nivel de 100 cc., se colocó un tapón de jebe y se agitó 25 veces. De esta fiola se tomó 0.1 cc. con una nueva pipeta que se colocó en una segunda fiola agitándose nuevamente 25 veces; de esta fiola se obtuvo las 10 alíquotas de 0.1 cc., las que fueron distribuidas en placas de Petri conteniendo 30 cc. de medio estéril controlado por incubación 24 horas antes de su empleo; las placas fueron numeradas de 1 a 10 en el orden en que fueron distribuidas las alíquotas. Una vez dejado caer el inóculo, se dispersó por medio de una bagueta de vidrio adecuada; las placas fueron incubadas a 34° de temperatura en pilas de 5 placas durante 24 horas.

Los recuentos fueron realizados por doble cuenta con un dispositivo de fabricación casera similar al contador de Quebec.

Todo este procedimiento fué realizado bajo estrictas condiciones de esterilidad y en un cubículo adecuado. El control de temperatura de la estufa tuvo un  $\pm 1.5^\circ$  de variación.

Dos series de experimentos fueron llevados a cabo con esta técnica, con el fin de establecer diferencias estadísticas. En la primera serie se emplearon grupos de 10 placas, y en la segunda serie, grupos de 5 placas; en cada serie fueron realizados 10 experimentos bajo las mismas condiciones, teniendo cuidado de usar los mismos stocks de medios, diluyente, temperatura, recultivando la cepa constantemente para evitar su envejecimiento que podría alterar nuestras determinaciones.

## RESULTADOS

Como puede verse en las tablas Nos. 1 y 2, el coeficiente de variación obtenido en la serie de 10 placas, tuvo un promedio de 11%, y en la serie de 5 placas, un promedio de 10.3%; ambos coeficientes ligeramente más altos que el 7% señalado por Snyder (104). Es posible que las diferencias obtenidas se deban a los siguientes hechos:

a) El empleo de un mayor número de placas, 60 en la serie de Snyder, mientras que en nuestras series sólo empleamos 10 y 5, disminuye el error total.

b) La distribución de las 10 alíquotas las hemos efectuado con una sola pipeta, y es prudente siempre considerar que la última alíquota contenida en la punta de la pipeta dá variaciones más altas que las otras alíquotas, razón por la cual algunos autores recomiendan no utilizar esta última.

c) Parece que la composición del diluyente empleado (gelatina), por la presión osmótica influiría en el hecho observado de que no existe una buena correlación entre la medida exacta de cada alíquota y el volumen de la gota que cae en el medio, sobre todo entre las alíquotas 4 y 8 (Véanse tablas Nos. 1 y 2), lo que aumentaría el error total. Ultimamente, con el fin de corregir este factor, hemos venido tocando la pipeta con el medio, cada vez que distribuíamos una alíquota, observando una considerable eliminación de las variaciones.

TABLA N.º 1

Orden de las Placas

SERIE DE 10 PLACAS

1	77	105	105	111	88	101	91	114	124	118
2	102	76	93	96	88	79	87	98	112	103
3	106	98	108	99	110	86	101	120	130	127
4	101	110	106	114	77	88	107	99	121	103
5	65	89	82	88	108	88	90	104	122	127
6	110	92	79	91	88	95	82	110	123	116
7	96	84	86	84	90	111	78	116	118	111
8	86	110	99	96	110	76	88	121	108	111
9	105	94	101	111	100	73	68	110	119	109
10	90	96	94	111	68	81	73	119	110	106

Media

93.2 95.4 95.6 100.7 92.7 87.8 86.5 111.1 118.7 113.1

Desviación Standard

13.88 10.99 10.51 11.22 12.20 11.82 8.42 6.09

Coefficiente Variac.

14.89 11.59 10.99 10.97 15.33 13.89 13.08 7.55 5.13 7.12

VALORES ESTADÍSTICOS DE LAS TRES PRIMERAS PLACAS

Media

93.0 93.0 102. 95.3 88.6 93.0 110.6 122. 116.

Desviación Stand.

13.8 15.13 7.93 7.93 7.93 12.62 9.05 7.21 8.50 9.16 9.43

Coefficiente Variac.

14.92 16.26 7.77 7.77 7.77 13.24 10.21 7.74 7.68 7.50 8.12

TABLA No. 2

Orden de las Placas		SERIE DE 5 PLACAS									
1	77	107	106	105	136	172	208	98	154	112	
2	86	96	132	104	148	207	153	89	135	97	
3	85	98	104	128	120	148	193	76	166	81	
4	96	104	121	105	152	183	171	90	135	104	
5	93	85	115	105	130	193	167	82	170	96	
Media	87.4	98.	117.	109.	137.	180.5	178.5	87.	152.	98.	
Desv. Standard	7.44	8.51	13.2	10.41	12.1	22.32	21.96	8.36	16.1	11.4	
Coef. Variación	8.5	8.7	11.2	9.6	8.8	12.0	12.3	9.6	10.66	11.63	

### B) Experimentación con el medio de McConkey:

Durante la experimentación con las dos series, fué difícil al inicio reducir el grado de contaminación en los grupos de placas sometidas a control de esterilidad. Un 20% de ellas, contenían 1 a 3 colonias correspondientes a bacterias del aire.

Posteriormente fuimos extremando nuestras condiciones de esterilidad, llegando a cubrir las placas con un papel estéril antes de ser colocadas en la estufa, reduciendo así nuestros porcentajes a 10 y 8%.

Ya se ha señalado en la literatura que éste es un hecho habitual cuando se emplea el método del plaquedo, sobre todo con medios nutritivos, y cuando Wilson (113) preconiza el método del tubo rotado, señala que este riesgo siempre se presentará en un 10%. Breed (15) cree que este porcentaje, aún cuando se tenga sumo cuidado puede llegar a ser de un 30%; no obstante, Crone (26) valora este factor de error en 1%.

El grado de contaminación está en relación con la composición nutritiva de los medios, y, de otro lado, cuando los medios son inhibidores, no favorecen el desarrollo de gérmenes del aire. Basándose en esta premisa, tratamos de ver si un medio con inhibidores no se apartaba significativamente de nuestros hallazgos.

Para tal fin seleccionamos el medio de McConkey (30), que si bien es un fuerte inhibidor de todas las formas cocoides y contaminantes del aire permite el desarrollo abundante de todos los bacilos Gram-negativos, preferentemente del género *Enterobactereáceas*; ésto permitirá aplicarlo en la cuantificación de bacterias en la orina desde que el 70 al 80% de este género son los agentes etiológicos de las infecciones urinarias (24) (32) (33) (39) (50) (61) (72) (88) (95).

Para tal fin, 20 series de 10 placas, con cada uno de los medios fueron realizadas siguiendo el método descrito anteriormente (véase métodos), cuyos resultados como se puede apreciar en las tablas Nos. 4, 5 y 6, demuestran no haber diferencias estadísticas significativas, entre ambos medios y los resultados totales comparativos de las 200 placas de cada medio tampoco aporta diferencias, como puede verse en el cuadro N° 1.



TABLA No. 3

Orden de las Placas	AS	MC	AS	MC	AS	MC	AS	MC	AS	MC	AS	MC
1	128	114	63	68	72	85	78	76	112	120		
2	131	98	68	81	88	105	69	63	101	124		
3	127	120	70	71	100	71	68	66	117	109		
4	115	99	64	59	107	99	68	67	107	127		
5	115	104	66	59	91	91	67	72	107	101		
6	127	140	73	82	107	98	74	64	93	94		
7	137	116	72	68	88	79	74	43	96	93		
8	131	121	63	68	109	75	72	69	91	105		
9	122	130	60	72	102	101	55	76	98	102		
10	129	119	74	56	96	78	68	68	102	107		
Media	126.2	116.1	67.3	68.7	96.0	88.2	68.7	66.4	102.4	108.2		
Desviación Standard	7.02	13.02	4.64	8.88	11.50	12.19	11.40	9.37	8.39	11.64		
Coefficiente Variac.	5.5	11.21	6.89	12.92	11.97	13.82	16.59	14.11	8.19	11.60		
VALORES ESTADÍSTICOS DE LAS TRES PRIMERAS PLACAS												
Media	128.6	110.6	66.7	71.3	86.8	87	71.6	68.3	110	117.6		
Desviación Standard	8.33	11.37	3.66	6.51	11.05	17.08	5.05	3.53	8.24	7.86		
Coefficiente Variac.	6.4	10.2	5.4	8.7	16.1	19.6	3.5	5.1	7.4	6.6		

TABLA No. 4

Orden de las Placas	AS	MC	AS	MC	AS	MC	AS	MC	AS	MC	AS	MC
1	130	165	139	115	130	137	142	136	176	169		
2	123	137	156	123	117	144	172	162	156	177		
3	134	137	128	138	113	148	163	150	155	181		
4	160	143	125	125	125	128	147	143	165	165		
5	159	119	110	140	125	132	152	162	169	187		
6	131	125	131	120	112	114	142	136	154	167		
7	140	127	118	129	118	137	147	141	167	177		
8	95	142	122	120	130	114	143	137	180	153		
9	169	128	129	137	158	117	145	163	161	164		
10	97	132	127	136	120	129	141	131	132	158		

Media	132.9	129.5	128.5	128.3	125.8	130.0	194.4	146.1	166.6	169.8		
Desviación Standard	23.42	11.53	12.39	12.11	10.96	12.00	3.25	12.72	11.50	10.60		
Coefficiente Variación	18.20	8.90	9.64	9.43	8.71	9.23	2.17	8.70	6.74	6.27		

VALORES ESTADISTICOS DE LAS TRES PRIMERAS PLACAS

Media	129	125.5	141	125.3	120	143	159	149.3	162.6	175.3		
Desviación Standard	19.42	18.48	11.10	11.66	8.88	5.56	12.55	9.73	11.55	6.12		
Coefficiente Variación	15.0	14.7	10	9.3	7.4	3.8	7.8	6.5	7.1	3.4		

TABLA No. 5

Orden de las Placas	AS	MC	AS	MC	AS	MC	AS	MC	AS	MC	AS	MC
1	88	84	91	91	97	101	124	120	118	84		
2	88	88	87	73	68	69	112	108	103	87		
3	110	84	101	89	95	86	130	108	127	125		
4	77	86	107	91	73	88	121	112	103	101		
5	108	102	90	88	78	88	122	113	127	88		
6	88	76	82	64	95	95	123	125	116	102		
7	90	77	78	68	78	111	118	115	114	93		
8	110	78	88	88	76	76	108	95	111	117		
9	100	112	68	78	81	73	119	120	109	147		
10	68	102	73	88	76	81	110	102	106	89		
Media	92.7	87.9	86.5	81.8	81.7	87.7	118.7	111.8	113.4	103.3		
Desviación Standard	14.2	18.6	11.9	10.08	10.24	11.74	6.51	8.97	8.78	20.42		
Coficiente Variación	15.3	21.1	13.7	12.3	11.16	13.3	5.4	8.08	7.76	19.2		
VALORES ESTADISTICOS DE LAS TRES PRIMERAS PLACAS												
Media	95.3	85.3	93.0	84.3	86.6	88.6	122.0	112.0	116	98.6		
Desviación Standard	12.70	16.44	14.73	9.87	16.20	14.64	9.16	6.99	12.12	22.6		
Coficiente Variación	13.32	13.65	15.83	11.70	18.7	16.5	7.5	6.2	10.4	22.9		

TABLA No. 6

Orden de las Placas	AS	MC	AS	MC	AS	MC	AS	MC	AS	MC
1	52	82	100	125	126	137	92	76	112	135
2	49	85	112	135	110	128	107	85	132	116
3	64	81	119	114	121	127	99	93	139	128
4	72	78	100	115	104	123	85	84	131	124
5	96	90	112	111	115	113	96	101	128	124
6	72	92	101	145	107	142	91	88	143	121
7	68	69	107	165	137	116	82	98	118	131
8	91	92	125	124	149	125	86	90	127	131
9	54	91	97	125	113	117	114	75	135	113
10	69	79	108	118	118	136	91	105	132	135
Media	68.7	83.9	108.1	127.7	120.	126.4	94.6	89.5	129.7	125.8
Desviación Standard	15.55	7.54	9.08	16.64	14.02	9.66	9.97	3.16	9.21	7.58
Coefficiente Variación	2.2	8.90	8.39	13.03	11.68	7.64	10.53	3.53	7.13	6.05

VALORES ESTADÍSTICOS DE LAS TRES PRIMERAS PLACAS

Media	55.	86.6	110.3	124.6	117.	130.6	99.6	84.6	127.6	126.3
Desviación Standard	7.9	1.73	9.61	10.51	8.24	5.91	7.51	5.46	14.01	9.6
Coefficiente Variación	14.3	2.0	8.7	8.4	7.8	4.5	7.5	6.4	10.9	7.6

CUADRO N° 1

DATOS ESTADISTICOS OBTENIDOS POR LA COMPARACION DE 200  
 PLACAS DE AGAR NUTRITIVO Y McCONKEY

AGAR NUTRITIVO	(Snyder)	McConkey
Media . . . . .	108.89 . . . . .	108.86
Desviación Standard.	28.79 . . . . .	27.59
Coefic. de Variación .	26.4% . . . . .	25.3%

## CAPITULO IV

### DIAGNOSTICO DE LA INFECCION URINARIA

El diagnóstico de una infección urinaria (52) (80) se basa en tres procedimientos:

- a) La investigación de la presencia de un agente infeccioso;
- b) El estudio de los factores que condicionan la infección; y
- c) El estudio del grado de compromiso renal.

La investigación del agente etiológico realizado mediante el diagnóstico bacteriológico, condiciona generalmente el estudio de los otros 2 procedimientos.

Con el fin de establecer su evaluación, analizaremos sistemáticamente sus diferentes etapas:

- a) Obtención de la muestra;
- b) Estudio del sedimento; y
- c) Cultivo cualitativo y cuantitativo.

#### A) OBTENCION DE LAS MUESTRAS

Es conveniente tener en cuenta las siguientes medidas:

1º Medidas generales que deben cumplirse estrictamente en el paciente.

2º Medidas que deben tomarse durante el proceso de extracción.

**Respecto de las primeras**, es preferible que los pacientes no estén sometidos a tratamiento con antibióticos, pues su excreción por la orina inhibe el desarrollo de los cultivos, habiendo encontrado Kass (56), en pacientes con pielonefritis activa, una cantidad inferior a  $10^7$  bact/ml. que podría hacer suponer que se tratase de una contaminación.

Se debe someter al paciente a las mismas condiciones a las que se somete para la prueba de Addis, lo que aumenta la posibilidad del hallazgo de los gérmenes, sobre todo en pacientes cuyo flujo bacterial es muy pequeño y en el que todo factor de dilución de la orina disminuiría la cantidad de bacterias aisladas (57).

El tiempo que toda orina permanece en la vejiga, es un aspecto muy poco considerado; Kass, recientemente (58a) ha señalado las propiedades que toda orina puede tener como medio de cultivo, al extremo de permitir el desarrollo de las bacterias depositadas largo tiempo en la vejiga.

Nosotros hemos realizado determinaciones comparativas con orina de retención de 7 horas y de retención de 1 hora en los mismos pacientes y bajo las mismas condiciones, encontrando una relación de 4 a 1, en la cantidad de bacterias de ambas determinaciones, y este debe ser uno de los factores a considerar cuando se realiza la evaluación de todo cultivo cualitativo. Siendo recomendable no hacer dichas determinaciones en pacientes cuya orina hubiese permanecido en la vejiga más de 4 horas, y más racional aún es expresar la cantidad de bacterias contenidas en la orina en la unidad de tiempo.

**En relación** a las segundas, un aspecto importante a tomarse en cuenta durante la extracción de la muestra, es la composición de la flora uretral tanto masculina como femenina.

La uretra masculina contiene normalmente pequeñas cantidades de bacterias (109) (111), habiéndose establecido que el 80% está constituido por *Staphilococo albus coaguloso negativo*, *Streptococo faecalis*, y *Diphtheroides*; y que el 20% lo constituye el género alcalígenos y *Escherichae coli*. Esta flora está depositada principalmente en los 5 primeros cc. como lo ha referido Helmholtz (47). Su estabilidad depende de las variaciones del pH de la orina (117) y su incremento muchas veces está establecido por las continuas manipulaciones, sean de instrumentación: cistoscopios, o por los catéteres permanentes; siendo el exudado que se produce entre el canal uretral y el catéter, un medio apropiado de cultivo que propicia la invasión de los gérmenes a la vejiga como ha sido demostrado experimentalmente por Guze y Beeson (42).

La flora normal de la vulva, está constituida a diferencia de la uretra masculina por un enorme predominio de bacilos Gram negativos, *Escherichae coli* (65) (99) (96), alcalígenos, lo que se explica por la estrecha relación con la flora anal.

Esta falta de esterilidad de ambas uretras y de la zona de la vulva, es la responsable de la introducción de gérmenes en la vejiga, sea por simples cateterizaciones (58) (77) (86), por utilización de catéteres permanentes (31) (65) (107), y también del arrastre de bacterias en las muestras obtenidas desarrollando falsas positividades (96) (9). Estas ra-

znes condicionan la recomendación de utilizar una estricta limpieza con desinfectantes de la zona que rodea el meato, y de la extracción preferentemente de la segunda porción de la orina. Recientemente Claubaut (21) con el fin de proteger al catéter empleado para la extracción de la muestra, recomienda la utilización de un segundo catéter interno, que disminuye considerablemente el factor contaminación como lo demuestra por sus resultados comparativos de las positividades de los cultivos de las orinas extraídas por ambos catéteres.

Es recomendable también que una vez obtenida la muestra, debe ser sembrada en un período de tiempo variable entre 1 a 2 horas, con el fin de evitar la reproducción que puede aún producirse con temperaturas de medio ambiente y en caso de no ser utilizada en este período, Kass (57) recomienda que las muestras pueden ser guardadas en el Freezer por un período de 48 horas, sin sufrir alteraciones

## B) ESTUDIO DEL SEDIMENTO.

Generalmente el estudio de un sedimento de orina, preferentemente obtenido de una orina aséptica, permite sospechar la presencia de una infección urinaria, aún antes de que se establezca el diagnóstico bacteriológico. Comprendiendo este estudio:

- a) Estudio de la reacción inflamatoria (piuria).
- b) Estudio de la coloración de Gram.

### a) **Reacción inflamatoria.**

Existe una serie de discrepancias en la literatura para establecer la cantidad de leucocitos que es considerado como reacción inflamatoria (piuria), siendo por lo tanto importante tener en cuenta los siguientes puntos:

1. Su cantidad; cualitativa o cuantitativamente.
2. Su relación con el hallazgo de gérmenes (Gram) o cultivo.
3. Su constancia.

1. El examen cualitativo realizado a partir de una orina recientemente centrifugada está sometido a enormes variabilidades dependientes de múltiples factores (número de revoluciones del centrifu-



gado, tiempo de centrifugación, espacio de tiempo que transcurre entre la toma de la muestra y su examen, cantidad de sedimento examinado, variaciones del pH de la orina, etc.). De manera que el criterio para determinar cuál es el número de leucocitos observado por campo microscópico, que tenga significación de reacción inflamatoria (piuria) es bastante variable. Sin embargo, parece aceptarse (68) (6), que un número mayor de 10 leucocitos por campo microscópico observado con lente de mediano aumento, ya tiene significación. Han sido señalados valores más bajos (57) (49), como 5 por campo, asociándolos a las características degenerativas de la morfología del leucocito. Otros autores (68) (103), no aceptan este criterio cualitativo debido a su variabilidad, por lo que recomiendan hacer las determinaciones cuantitativas mediante el método de Addis (2).

2. La falta de relación, entre la presencia de reacción inflamatoria (piuria), sin bacteriuria se presenta en varias enfermedades: Infecciones urinarias tuberculosas; infecciones a gérmenes anaerobios (98); y en las pielonefritis crónicas, cuyo grado de esclerosis renal no permite el pasaje de bacterias (10) (93), o por defectos técnicos en la recolección de la muestra, en los que existiría pasaje de leucocitos de la vagina. Más frecuentemente se presenta la falta de relación en sentido inverso, encontrándose una marcada bacteriuria que supera el hallazgo de  $10^7$  bact/cc. de orina (57), sin reacción inflamatoria, observándose sobre todo en pacientes portadores de una infección crónica (105) (73), diabéticos (7), y en quienes repetidos exámenes de orina no podían evidenciarles la elevada bacteriuria que portaban, y por no presentar piuria; Kass (57), estudiando un grupo de pacientes mujeres del hospital de la ciudad de Boston, asintomáticos, y en las que constató una bacteriuria superior a  $10^7$ ; el 60% no presentaron reacción inflamatoria; Sanford (96), de 91 casos de pacientes que tuvieron cifras superiores a  $10^7$ , el 13%; Marple (77) el 10%; Leishman (65) el 10%.

3. Este concepto sobre el que los autores (98) (34) (68), han venido llamando la atención, el que puede explicar parcialmente las razones discutidas en 2, y que parece estar relacionado con la intermitencia del pasaje de leucocitos del riñón, dependiente de la apertura de micro-abscesos renales que dejan escapar tanto bacterias como leucocitos.

En 1951 Sternheimer y Malbin (106) empleando una coloración vital a base de Violeta de Genciana y Safranina, pudieron observar un tipo de leucocitos que tenían características tintoreales especiales; presentando una coloración pálida azulina y en el citoplasma granulaciones que tenían un movimiento browniano denominado Glitter cells; que eran encontradas en sujetos portadores de una pielonefritis crónica, sugiriendo su empleo como una ayuda en el diagnóstico de las pielonefritis.

Desde esta comunicación, numerosas publicaciones se encuentran en la literatura con el fin de estudiar tanto su patogénesis y su relación con el cuadro clínico de pielonefritis, permaneciendo aún obscuro el primer aspecto. Pero habiéndose determinado que indudablemente el hallazgo en el sedimento si bien no es un signo patognomónico como se intenta utilizarlo; constituye una importante ayuda en el diagnóstico de los procesos inflamatorios netamente renales, pero es bueno consignar que su hallazgo también ha sido descrito en otros tipos de secreciones: prostáticas (11), vaginales y aun en la sangre (50a).

Sternheimer subrayaba que la principal característica de identificación de estas células la constituía el Glitter cells, posteriormente se ha observado que este movimiento, está sometido a una serie de factores: baja de la tensión superficial (110), disminución de la concentración osmolar de la orina (113). Recientemente Poirier, (90b) analizando los diferentes tipos de leucocitos en relación a un estudio con biopsias renales, pudo establecer que no era tan importante la presencia de este fenómeno, como lo es la palidez de las células para establecer la verdadera positividad de este examen.

Es indudable que esta coloración de fácil manejo, desde que sólo es necesario poner una gota del colorante con el sedimento, es de una gran ayuda para el estudio del sedimento urinario, ya que facilita la conservación de los diferentes componentes y puede determinar este tipo de leucocitos llamados Células de Pielonefritis.

### C) COLORACION DE GRAM.

La presencia de bacterias en una preparación de Gram, proporcional al Clínico de una manera sencilla, fácil y práctica, la evidencia de una infección urinaria, ya que por los caracteres morfológicos y reacción tintoreal del tipo de bacterio observado, el clínico muchas veces puede orientar su terapia antibacteriana. Algunas veces antes de

obtener el resultado del cultivo o antibiograma, siendo de enorme utilidad sobre todo cuando no se dispone de un laboratorio de bacteriología. La apreciación de su cantidad facilita al técnico calcular aproximadamente la cantidad de inóculo que debe emplear en su siembra.

Nosotros cuando comenzamos a aplicar la técnica del plaqueado en la cuantificación de bacterias de orina, la positividad del Gram, permitía orientarnos a calcular la dilución que necesitábamos realizar, de manera que obtuviésemos un número adecuado de colonias que nos permitiese efectuar su conteo sin la dificultad del sobredesarrollo y confluencia.

Esto no era muy exacto porque desconocíamos la cantidad de bact./ml. que era necesaria para que el Gram se hiciese positivo, tanto a partir de la muestra centrifugada como de aquella sin centrifugar. Este hecho permanecía incierto y confuso aún para los autores que habían realizado determinaciones de bacterias de la orina; algunos se limitaban a mencionar aproximadamente una cantidad: Jawetz (52), Beeson (9), Keefer (59), suponen que una cantidad mayor de 10,000 bact./ml. condiciona la positividad a partir del sedimento; Knight (63) y Kass (57) afirman que debe existir una cantidad mayor que 100,000 bact./ml. para que el Gram a partir de una muestra de orina sin centrifugar sea positiva; solamente en el trabajo de Sanford (96) y Kass (58a), se puede encontrar una idea clara a este respecto.

Sanford encuentra en el grupo de pacientes cuya cantidad de bacterias estaba entre 1,000 a 10,000, que el Gram era discretamente positivo (uno o dos bacilos por campo) en un 23%. Mientras que en el grupo de pacientes cuya orina contenía más de 10,000 bact./ml. todos fueron positivos. Kass trabajando con muestras de orina sin centrifugar en un grupo de pacientes cuya cuantificación oscilaba entre 100 y 100,000 bact./ml. encontró un 20% de positivos y 80% fueron positivos cuando la muestra excedió las 100,000 bact./ml.. De donde resultaba imperioso establecer dichos límites, más que como una simple inquietud científica, como un hecho de una importante aplicación práctica, que podía servir no solamente de ayuda técnica en la cuantificación entre las muestras contaminadas y verdaderas bacteriurias, como analizaremos en el capítulo de cultivo cuantitativo, observándose que algunos autores (24) (49) creen que es tan práctico que incluso lo emplean rutinariamente mientras los pacientes hacen antecala.

Dos series de experimentos fueron llevados a cabo en el laboratorio, y una tercera serie comprendió determinaciones realizadas con cuadros clínicos. En principio, las tres series, de 20 experimentos cada una, fueron realizadas sobre la base del método seleccionado por nosotros, con discretas modificaciones surgidas por la necesidad de efectuar nuevas diluciones que nos permitiesen obtener el inóculo para la preparación de las láminas.

#### SERIE I.— METODO.

Una décima de un cultivo de 24 horas de desarrollo de la misma cepa de *Escherichae Coli* utilizada anteriormente, fué colocada en una folia, la que se completó a 10 cc. con el diluyente (dilución  $10^{10}$ ); después de una previa agitación (25 veces) se tomaron 10 cc. y se colocaron en una segunda fiola que completado a 100 cc. daba la dilución  $10^9$ . De esta dilución se tomó 1 cc. que fué colocado en una segunda fiola y también completado a 100 cc. (dilución  $10^8$ ). Esta última sirvió para la extracción de las alíquotas que se distribuyeron en series de 10 y 5 placas y que siguió el proceso anteriormente anotado. La preparación de las láminas se efectuó de la siguiente manera: De las diluciones  $10^8$  y  $10^9$  previa agitación, se tomó una azoda de 5 mm. de diámetro y se colocó en una lámina portaobjeto (lámina denominada sin centrifugar); 10 cc. de las mismas diluciones se centrifugaron a 2,500 r. m. durante 5 minutos, eliminando el sobrenadante y utilizando la misma asa de platino se extrajo un inóculo para una segunda lámina (lámina centrifugada). Ambas láminas después de fijadas, se colorearon con azul de metileno por 5 minutos. Esta coloración debido a lo limitado de su manipulación evitó la pérdida del frotis. Fueron consideradas positivas sólo las láminas que contuvieron un mínimo de 5 bacilos por campo 1 +; 2++ aquéllas con más de 10 bacilos por campo y con 3 +++ las que presentaron incontable cantidad de bacilos por campo microscópico.

La valoración de la cantidad de bacterias contenidas en las diluciones  $10^8$  y  $10^9$ , se obtuvo de la correlación con la cantidad de bacterias obtenida en la dilución  $10^{10}$  media de la serie de placas, siguiendo la ley exponencial de Poisson y teniendo en cuenta que el factor de dilución es mínimo, ejemplo: si la media de una serie de placas de la dilución  $10^{10}$  fué 83; en la dilución  $10^8$  deben haber 830; en la  $10^9$  8,300 y en la  $10^{10}$  83,000.

Como se puede ver en los resultados de esta serie (Tablas Nos. 7, 8 y 9), el número mínimo de bacterias que nos dió un Gram positivo en la muestra centrifugada, fué 8,320, y en la muestra sin centrifugar: 83,000, valores que no nos permitían establecer un necesario límite para observar la aparición de la positividad del Gram. Para este fin fué necesario hacer diluciones más bajas que nos aproximara a este límite; conociendo el promedio de las medias de nuestras series anteriores fué aproximadamente de 100 bact./cc en la dilución  $10^2$ , y conociendo que el factor de error de la dilución es pequeño, podemos suponer que en la dilución  $10^1$ , la cantidad fué aproximadamente de 10,000 bact/cc. Con esta hipótesis, se podrá entonces lograr diluciones a partir de la dilución  $10^3$ , que nos dieran valores aproximados para 5,000 y 15,000 bact./cc. y a partir de ellas obtener las preparaciones para el Gram. Este es el fundamento de la serie II que luego describiremos.

#### SERIE II.— METODO.

Esta serie fué realizada con la misma sistemática que la serie I, diferenciándose sólo en el proceso de obtención del inóculo para las láminas:

Para hacer una dilución en que se obtuviera la cantidad aproximada de 5,000 bact./cc., se tomó 5 cc. de la dilución  $10^2$ , que colocados en una folia se completaron a 100 cc. A partir de ellas, se hicieron las láminas para el Gram, tanto para las láminas denominadas sin centrifugar, como centrifugadas.

Para obtener 10,000 bact/cc. se tomó la muestra de la dilución  $10^1$ , como en la serie I.

Y en la dilución en que aproximadamente se podría obtener 15,000 bact/cc. se realizó colocando 15 cc. de la dilución  $10^2$  y se llevó a cabo el mismo procedimiento para la preparación de la lámina.

Los resultados de estos tres tipos de preparaciones se encuentran en la tabla N<sup>o</sup> 10.

Completadas dos series, se pudo tener una idea de la cantidad de bacterias que era necesario que existiese en la solución para dar positividad al Gram, determinándose que aproximadamente a partir de 5,000 bact/cc. el Gram se hace positivo en las láminas de nuestras

centrifugados. Véase Cuadro N<sup>o</sup> 2. Era ahora imperioso comparar estas dos series realizadas a partir de cultivos de 24 horas, con series a partir de muestras de orinas de pacientes de infecciones urinarias.

### SERIE III.— METODO.

Los datos fueron obtenidos de la cuantificación de bacterias que se efectuó en los pacientes con infecciones urinarias, prefiriendo aquellas que necesitaron para su cuantificación diluciones más altas a 10'; el método seguido fué el mismo de la serie I.

### RESULTADOS.

Las técnicas utilizadas tanto a partir de un cultivo de 24 horas (series I y II) como de cultivos de orina de pacientes de Infecciones urinarias (serie III), nos han permitido establecer (véase Cuadro N<sup>o</sup> 2) que la positividad del Gram a partir de las muestras centrifugadas se hace positivo cuando la concentración de bact/ml. excede a los 5,000/mi; y en las muestras sin centrifugar, el Gram es positivo cuando existe una mayor cantidad de 50,000 bact/ml; este resultado estaría de acuerdo con Sanford (96) quien suponía que el Gram comenzaba a hacerse positivo entre los 5,000 a 10,000 bact/ml; y con Philpot (90a) quien encontró, al estudiar su grupo de 50 hombres aparentemente normales, 1 caso con Gram positivo cuya cuantificación fué de 5,700 bact/ml. Estos hallazgos serían de una ayuda invaluable al bacteriólogo en la cuantificación de bacterias, porque le permite orientar la dilución a lo que debe someter su muestra de orina, para obtener adecuada y proporcional cantidad de bacterias en las placas. Permitiendo además por una técnica sencilla establecer aproximadamente una diferencia entre las muestras contaminadas durante la extracción de las muestras y las verdaderas bacteriurias de la Infección Urinaria.

TABLA No. 7

No. de las Placas	AS	MC	AS	MC	AS	MC	AS	MC	AS	MC	AS	MC
1	88	101	91	114	124	118	102	76	105	111		
2	88	79	87	98	112	103	100	110	93	96		
3	110	86	101	120	130	127	101	105	108	99		
4	77	88	107	99	121	103	65	98	106	114		
5	108	88	99	104	122	127	110	92	82	88		
6	88	95	92	140	123	116	96	89	94	94		
7	90	111	78	116	118	114	86	84	79	84		
8	110	76	88	121	108	111	105	110	86	96		
9	110	73	68	130	119	109	90	94	59	111		
10	68	81	73	119	110	106	77	96	104	114		
Media	92.7	87.8	86.5	111.1	118.7	113.4	93.2	95.5	95.7	100.7		
Desviación Standard	14.22	12.20	11.82	8.42	6.09	8.08	13	12.4	11.1	12.3		
Coefficiente de Variación	15.33	13.89	13.08	7.55	5.13	7.12	13.9	13.90	11.70	12.5		
10 <sup>-3</sup> SC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
10 <sup>-3</sup> SC	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--		
C	+	+	+	++	++	++	+	+	+	++		

TABLA No. 8

No. de las Placas	AS	MC	AS	MC	AS	MC	AS	MC	AS	MC	AS	MC
1	82	98	98	77	112	107	128	119	208	172		
2	85	74	89	86	97	85	140	136	153	207		
3	81	89	76	85	81	98	121	148	193	148		
4	78	76	90	96	101	98	120	120	171	183		
5	90	82	82	93	96	104	125	130	167	193		
Media	83.2	83.8	87	87.4	98	98	128.8	130.6	178.5	180.5		
Desviación Standard	14	9.88	8.36	75.2	11.4	8.51	8.7	12.28	21.96	22.32		
Coefficiente de Variación	12.5	11.78	9.6	8.6	11.63	8.7	6.75	9.40	12.3	12.0		
Dilución 10 <sup>-3</sup>	+	+	+	+	+	+	++	++	+++	+++		
C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
Dilución 10 <sup>-4</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
C	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++		



TABLA No. 9

SERIE I

DILUCION 10 <sup>3</sup>			DILUCION 10 <sup>4</sup>		
No. de Bacteria	GRAM		No. de Bacteria	GRAM	
	SC	C		SC	C
83,200	--	+++	8,320	--	+
83,800	+	+++	8,300	--	+
86,500	+	+++	8,650	--	+
87,000	+	+++	8,700	--	+
87,400	+	+++	8,740	--	+
87,800	+	+++	8,780	--	+
92,700	+	+++	9,270	--	+
93,200	+	+++	9,320	--	+
95,500	+	+++	9,550	--	+
95,700	+	+++	9,750	--	+
98,000	+	+++	9,800	--	+
98,000	+	+++	9,800	--	+
109,700	++	+++	10,070	--	+
111,100	++	+++	11,110	--	+
113,400	++	+++	11,340	--	+
118,700	++	+++	11,870	--	+
128,000	++	+++	12,800	--	+
130,000	+++	+++	13,000	--	+
178,000	+++	+++	17,800	--	++
180,000	+++	+++	18,000	--	++

TABLA No. 10

SERIE II

No. de Bacterias	GRAM		No. de Bacteria	GRAM		No. de Bacteria	GRAM	
	SC	C		SC	C		SC	C
3,435	—	—	6,870	—	+	10,305	—	++
4,600	—	—	9,200	—	++	13,800	—	++
4,730	—	—	9,400	—	++	14,190	—	++
4,800	—	—	9,600	—	++	14,400	—	++
4,800	—	—	9,600	—	++	14,400	—	++
4,900	—	—	9,800	—	++	14,700	—	++
5,200	—	—	10,400	—	++	15,600	—	++
5,200	—	—	10,400	—	++	15,600	—	++
5,300	—	—	10,600	—	++	15,900	—	++
5,405	—	—	10,810	—	++	16,215	—	++
5,660	—	+	11,200	—	++	16,800	—	++
6,000	—	+	11,340	—	++	17,000	—	++
6,100	—	+	12,000	—	++	18,000	—	++
6,150	—	+	12,200	—	++	18,300	—	++
6,250	—	+	12,300	—	++	18,450	—	++
6,425	+	+	12,500	—	++	18,870	—	++
6,485	—	+	12,850	—	++	19,275	—	++
6,600	—	+	12,970	—	++	19,455	—	++
6,800	—	++	13,200	—	++	19,800	—	++
			13,600	—	++	20,400	—	++

TABLA No. II

SERIE III

No. de Bacteria	GRAM		No. de Bacteria	GRAM	
	SC	C		SC	C
5,980	—	+	598	—	—
6,460	—	+	646	—	—
6,900	—	+	690	—	—
7,480	—	—	748	—	—
7,540	—	+	754	—	—
9,000	—	+	900	—	—
9,500	—	++	950	—	—
11,120	—	+++	1,112	—	—
11,400	—	+++	1,140	—	—
14,000	—	+++	1,400	—	—
18,000	—	+++	1,800	—	—
30,000	±	+++	3,000	—	—
30,000	±	+++	3,000	—	—
40,000	±	+++	4,000	—	—
48,000	—	+++	4,800	—	—
59,000	+	+++	5,900	—	—
59,980	+	+++	5,998	—	—
70,000	++	+++	7,000	—	—
78,000	++	+++	7,800	—	+
150,000	+++	+++	15,000	—	++

CUADRO No. 2

No. BACTERIAS		No. de Observaciones	GRAM Sin Centrifugar	GRAM Centrifugado
			+	+
0	—	1,000	7	0
1,000	—	2,000	1	0
2,000	—	3,000	0	0
4,000	—	5,000	3	0
5,000	—	6,000	10	5
6,700	—	7,000	10	10
7,000	—	8,000	4	4
8,000	—	9,000	8	8
9,000	—	10,000	12	12
10,000	—	20,000	46	46
20,000	—	30,000	2	2
30,000	—	50,000	2	2
50,000	—	100,000	16	16
100,000	—	180,000	9	9
T O T A L		140		

No. BACTERIAS		No. de Observaciones	GRAM S.C.	% de POSITIVIDAD C.
0	—	5,000	21	0
5,000	—	10,000	44	88
10,000	—	50,000	50	100
+	de	50,000	25	100
T O T A L :		140		

NOTA: Se estableció significación estadística de los valores observados mediante la prueba de CHI (121) encontrándose valores menores de 0.10.

## CULTIVO CUANTITATIVO

El hallazgo de bacterias en un cultivo de orina es una comprobación suficiente para afirmar el diagnóstico de una infección urinaria. Una serie de factores que hemos venido analizando anteriormente pueden dar falsas positividads, a pesar de las rigurosas técnicas cualitativas que el bacteriólogo emplea, lo que puede desorientar el diagnóstico clínico.

Durante los dos últimos años se ha tratado de resolver este aspecto recomendando el empleo de una técnica cuantitativa que permite evaluar en forma más exacta la positividad del cultivo de orina.

Fatalmente muchas de estas referencias (34) (29) (59) sólo se limitan a establecer cifras arbitrarias para distinguir contaminación de infección: algunos (9) (52) creen que este límite se encuentra en 10,000 bact./ml.; otros (57) (83) sólo consideran verdadera bacteriuria cuando la cantidad de bacterias es superior a 100,000 bact./ml.

Este problema se ha venido aclarando anteriormente cuando se han realizado determinaciones cuantitativas de bacterias en la orina correlacionándolas con el cuadro clínico (57), con el tipo de bacterias (96) y con los hallazgos anatomopatológicos (83).

Marple (77) en 1940 ha sido el primero en introducir el criterio cuantitativo para establecer el diagnóstico bacteriológico exacto. Este autor, sorprendido por la enorme incidencia de cultivos positivos de orina que eran hallados en pacientes hospitalizados que carecían de sintomatología del tracto urinario, realizó determinaciones cuantitativas empleando el método de la placa vertida ("pour plate"), en 100 mujeres hospitalizadas en el servicio médico de la Universidad de Stanford, encontrando que 31 de ellas tenían significativas cantidades de bacterias en su orina; sus determinaciones fueron hechas en forma seriada y con correlación clínica, estableciendo pautas para el estudio de pacientes de infecciones urinarias y recomendando como imperiosa necesidad el empleo de la determinación cuantitativa, desgraciadamente, su trabajo no establece la cantidad necesaria de bacterias para considerar la verdadera bacteriuria.

Kass (56) en su primera comunicación del año 1955, dá sugerencias preliminares de enorme importancia para la aplicación de esta técnica; él cree que una proporción mayor que 100,000 bact/ml.

de orina, tiene una significación valiosa de infección. Cuando se efectúa la cuantificación es bueno tener en cuenta el segmento de donde procede la orina, pues existen variaciones en la cantidad, en los diferentes segmentos; además, hace la observación que uno puede hacer determinaciones menores que 100,000 bact/ml. aún en pacientes en que se comprueba una pielonefritis activa, lo que depende de los siguientes factores:

a) Presencia de un agente bacteriostático; b) rapidez del flujo bacterial; c) pH urinario; d) la presencia de organismos de difícil desarrollo; e) factores mecánicos de obstrucción.

Posteriormente, en 1956 (57) en un trabajo más amplio y con el propósito de subrayar la importancia de las bacteriurias asintomáticas, establece definitivamente que una proporción mayor de 100,000 bact/ml. tiene significación clínica de infección y que cantidades menores pueden corresponder a contaminación de la muestra.

Al iniciar nuestros estudios de cuantificación de bacterias en la orina, en 1956, empleamos durante 8 meses, el método de la placa vertida ("pour plate"), con la misma sistemática de Anderson (4) y Sanford (96).

La experiencia que fuimos logrando con la aplicación de este método, y los constantes análisis a que fuimos sometiendo el método, nos ha permitido establecer que esta técnica no era todo lo exacta que se requería y presentaba algunas desventajas que enumeraremos a continuación.

1. Dificultad en determinar con exactitud la temperatura del medio utilizado que, como hemos analizado en el capítulo I, es de mucha importancia.
2. La falta de uniformidad en la mezcla del inóculo-medio que se obtiene con el método de agitación de la placa.
3. La utilización de una placa, que aumenta desproporcionadamente el factor de error, no siendo permisible estadísticamente.

Estas razones nos impulsaron a abandonar la técnica y realizar una estricta revisión de la literatura con respecto a los métodos que se emplean en la cuantificación de bacterias, con el fin de seleccionar

un método que nos resultase fácilmente aplicable y exacto. En este sentido los trabajos de Snyder (104) y Wilson (113), han sido de una ayuda invaluable para ir obteniendo una experiencia en la cuantificación de bacterias y hacer aplicable un método a nuestros propósitos de cuantificar bacterias en la orina.

La sistemática de análisis que hemos venido desarrollando, ha sido la siguiente:

- a) Selección del método del plaqueado, estableciendo nuestros propios factores de error con este método.
- b) La experimentación con un medio de McConkey; con el fin de utilizar uno que impidiese las contaminaciones.
- c) Los estudios experimentales de la cuantificación de bacterias y su correlación con el gram.

Esta sistemática nos ha permitido contar en la actualidad en nuestro Departamento de Bacteriología de la Cátedra de Clínica Médica del Hospital Loayza con una técnica de cuantificación de bacterias exacta y fácilmente aplicable.

## TECNICA DE LA CUANTIFICACION DE BACTERIAS EN LA ORINA

Metódicamente empleada en nuestro laboratorio:

### A) **Recomendaciones generales para la toma de la muestra:**

Los pacientes deben estar sometidos a las mismas condiciones que cuando se efectúa la prueba de Addis; esto permitirá obtener una orina concentrada.

La toma de la muestra debe estar encomendada a un personal entrenado o ser efectuada por el mismo bacteriólogo, quien, mediante una cuidadosa limpieza de los márgenes del meato con soluciones desinfectantes (principalmente cloruro del alquil-benzilamina), evitará la introducción de bacterias contaminadas.

Es preferible la utilización de sondas metálicas o de vidrio por su inocuidad, facilidad de esterilización y fácil manejo. La obtención de la muestra debe ser efectuada una o dos horas después de haber vaciado la vejiga voluntariamente. Este método permite:

- a) Establecer una cuantificación de bacterias en la unidad de tiempo.
- b) Obtener una orina aproximadamente igual a la del flujo bacterial renal.
- c) Limitar el factor de reproducción bacterial a nivel vesical.

Una vez obtenida la muestra, de no ser utilizada en un período de dos horas, debe ser guardada en la refrigeradora para evitar la reproducción de bacterias que puede producirse a temperatura ambiente.

#### B) Método de cuantificación de bacterias de la orina.

Tanto durante el proceso de preparación de las placas, como durante el período de control de esterilidad (24 horas antes de su uso), éstas deben estar rodeadas de las máximas precauciones de esterilidad con el fin de disminuir el factor de contaminación que habitualmente se presenta en los laboratorios.

Si las condiciones del laboratorio no permitieran obtener un porcentaje menor al 10% es preferible la utilización del medio de Mc Conkey, que, como hemos demostrado, no difiere sustancialmente de los medios nutritivos teniendo la ventaja de impedir la contaminación y de poderse guardar por un tiempo mayor los stock de los medios, así como de permitir una diferenciación precoz de los gérmenes, sobre todo cuando existen dos tipos de gérmenes.

Dentro del período en que es prudente realizar la cuantificación una vez obtenida la muestra, un primer paso será la realización de coloración de Gram haciendo un frotis de la muestra sin centrifugar, como de un sedimento. Los resultados obtenidos en nuestras series experimentales nos han llevado a utilizar esta técnica como una guía precisa para la realización de las diluciones de muestra de orina:

- a) Cuando la coloración de Gram fuese positiva en ambas láminas se elegirá la utilización de diluciones entre  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ .
- b) Cuando el Gram resultase positivo solamente en la lámina del sedimento, la dilución a efectuarse en la muestra oscilará entre  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ .
- c) Cuando la coloración del Gram resultase negativa en ambas láminas, se realizará una dilución de  $10^{-2}$ .



Seleccionadas las diluciones que han de emplearse, las directivas del proceso siguen las mismas indicaciones que hemos descrito en la parte experimental, cuando repetimos la técnica del plaquedo recomendada por Snyder. Aquí sólo nos limitaremos a describir algunas pequeñas modificaciones y recomendaciones:

a) Es preferible para la realización de las diluciones el empleo de fiolas en lugar de tubos, por las siguientes razones:

1º Se realiza menor número de diluciones.

2º Permite una mayor agitación de las soluciones lo que facilita tanto la ruptura de los grumos ("clumping") como una mejor distribución de las alíquotas en las soluciones.

b) Hemos llegado a la conclusión que el número de placas que deben emplearse en la cuantificación a partir de cada dilución debe ser de cuatro, eliminando una de ellas que durante el contaje se elige decididamente de las otras tres; esta indicación está basada en el trabajo de Wilson y Kullmann (116) y también en nuestras propias observaciones, al comparar nuestras series experimentales (véase cuadro Nº 1 y Nº 2) en que hemos encontrado diferencias significativas en la serie de 10 placas y las tres primeras placas utilizadas en la serie.

c) Una recomendación importante es el hecho de distribuir las alíquotas tocando la punta de la pipeta con la superficie del medio con el fin de disminuir el factor de error total.

d) Debe eliminarse toda placa cuyo número de colonias desarrolladas sobrepase a doscientos.

## CAPITULO V

### APLICACIONES CLINICAS

La cuantificación de bacterias de orina viene siendo utilizado principalmente para dos objetivos:

a) Diferenciación de falsas positividades por contaminación de verdaderas bacteriurias.

b) Evaluación de la terapia antibacteriana.

a) Todos los autores (52) (77) (96) (58-b) que han empleado la técnica de cuantificación de bacterias en la orina, han dirigido su atención sobre este aspecto, como hemos analizado anteriormente.

Presentamos como ejemplo de esta aplicación, un grupo de 10 casos, extraído de nuestro archivo de pacientes estudiados en el Hospital Loayza. (Véase Cuadro N° 3). En este grupo, como puede observarse, sólo el cultivo cuantitativo pudo establecer la exactitud del resultado del cultivo.

b) El problema del tratamiento en las infecciones urinarias, constituye aún un serio problema (13) (17) (32) (46) (50) a pesar del avance logrado con la terapia antibiótica. Una serie de factores han sido señalados como condicionantes de la cronicidad y de las repetidas recidivas que es frecuente observar: (a) factores de obstrucción mecánica (25) (71); malformaciones congénitas (33); algunas entidades: diabetes (7), embarazo (73) (89); sumándose además 2 complicaciones surgidas con el empleo de la terapia con antibióticos como son: la enorme incidencia de cepas resistentes (39) (44) (61) (88) (92) y los cambios de la flora urinaria observada durante el tratamiento (5) (20) (120).

La evaluación sobre la eficacia de la terapia antibacteriana, generalmente se efectúa mediante el control de un cultivo cualitativo, pero esto es relativo, porque si el cultivo permanece positivo no proporciona el dato si ha aumentado la cantidad de bacterias o ha disminuído. Linneweh (68) en sus 30 casos observó que el 80% tenían cultivo cualitativo positivo, pero que la cantidad de bacterias era insignificante en el cultivo cuantitativo. Estas razones han impulsado a que el cultivo cuantitativo sea utilizado para evaluar la terapia antibacteriana.

La sistemática empleada en nuestro laboratorio, establece que cuando un cultivo cuantitativo resulta positivo, efectuamos controles serios de cuantificación para evaluar la terapia; el segundo control es efectuado el 5º día de iniciada la terapia y el tercer control, 5 días después de terminado el tratamiento; esta aplicación del método del cuantitativo nos indica de manera más exacta la eficacia terapéutica.

Nosotros hemos seleccionado un grupo de pacientes (Grupo N° 2) cuyos controles cuantitativos resultaron negativos demostrando una real desaparición de la bacteriuria.

En el Grupo N° 3, presentamos 6 casos en que el cultivo pudo orientar al clínico sobre la acción de los antibióticos; en los casos 3, 4 y 5, la cantidad era elevada pero fué disminuyendo paulatinamente; en los casos 1 y 2 los pacientes estaban asintomáticos y no mostraban reacción inflamatoria, sólo los cultivos cuantitativos nos permitieron establecer la magnitud de la infección.

Caso	Edad	Fecha	Síntomas Urinaríos	Diagnóstico Presuntivo	Reacción Inflamatoria Leucocitos x campo	Gram	Cultivo Cualitativo	Cultivo Cuantita- tivo 10 <sup>-2</sup>
J.B.	22	24-V	Disuria	Pielonefri- tis.	2 x campo	Neg.	Alcaligenes	Negativo
T.R.	10	29-VI	Poliaqui- ria. Disu- ria.	Pielonefri- tis.	8 x campo	Neg.	Streptococo faecalis	Negativo
C.M.	20	5-VI	Disuria	Pielonefri- tis	1 en varios campos	Neg.	E. Coli	Negativo.
A.Z.	43	10-VII	Dolor lumbar. Disuria.	Pielonefri- tis	20 x campo	Neg.	E. Coli	Negativo
V.V.	33	8-VIII	Dolor lumbar. Febrícula	Riñón poli- quístico Pie- lonefritis.	4 x campo	Neg.	Staphilococo coagu- losa Negativo	Negativo
Z.Y.	25	9-IX	Poliquiuria Disuria.	Litiasis renal, Pielonefritis.	1 en varios campos	Neg.	Alcaligenes	Negativo.
N.V.	43	12-X	Disuria. Dolor lumbar.	Pielonefri- tis.	10 x campo	Neg.	Stafilococo coagulosa Negativo.	Negativo.
J. A.	55	22-XI	Fiebre. Dolor lumbar.	Pielonefritis, Diabetes.	4 x campo	Neg.	Acrobacter Aerogenes	Negativo.

## GRUPO No. 2

## Caso No. 1

Día	25-VI	26	27	28	29	30-VI	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Dilución	10 <sup>-3</sup>					10 <sup>-2</sup>										10 <sup>-2</sup>
	15					-										-
	20					-										-
	40					-										-
	11					-										-
	14					-										-
Media	14															
Desv. Stand.	3.9															
Coef. Var.	28															
No. Bact.	14,000															
x cc. orina	E. Coli					Neg.										Neg.
Germen aislado	+					-										-
Gram																
Leucocit.																
(mayor de 10X c.)	++					+++										-
Síntomas urinarios	+															-

SIGMAMICINA

GRUPO No. 2

Caso No. 2

Día	23-IV	24	25	26	27	28-IV	29	30	1	2	3	4	5	6	7-V
Dilución	10 <sup>-5</sup>					10 <sup>-2</sup>									10 <sup>-2</sup>
	81														
	60														
	79														
	78														
	76														
Media	74.8														
Desv. Standard	8.46														
Coef. Variación	11														
No. Bacterias x cc. orina	748,000														
Germen aislado	E. Coli														
Gram	+++														
Leucocitos															
(mayor de 10 por campo)	+++					+++									+++
Síntomas Urinarios	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-

ESTREPTOMICINA  
CLOROMICETINA

Tratamiento

## GRUPO No. 2

## CASO No. 3

Día	5-VI	6	7	8	9	10-VI	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20-VI	
						$10^{-5}$											$10^{-2}$
						135											--
						101											--
						154											--
						135											--
						138											--
Media						144.6											--
Desv. Standard						12.08											--
Coef. Variac.						14											--
No. Bacterias						1444,000											--
Germen						Paracolon Coliformis											--
Gram						+											--
Leucocitos						++											--
(mayor 10 por campo)																	--
Síntomas Urinarios						++	++	++	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Tratamiento	S I G M A M I C I N A																

GRUPO No. 2

Caso No. 4

Día	31-V	1	2	3	4	5-V	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17-V	
Dilución	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>
Media	125	110	121	140	112	121.6	12	9.8	9'809,000	E. Coli	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Desv. Standard																			
Coef. Variac.																			
No. Bacterias																			
Germe																			
Gram																			
Leucocitos																			
(mayor de 10 por campo)																			
Síntomas Urinarios																			
Tratamiento																			

[ S I G M A M I C I N A ]



GRUPO No. 2

Caso No. 5

Día	9-V	10	11	12	13	14	15-V	16	17	18	19	20	21	22-V
Dilución	10 <sup>-5</sup>						—							
	70						—							
	66						—							
	17						—							
	70						—							
	70						—							
Media	64.6						—							
Desv. Stand.	9.87						—							
Coeff. Variac.	15						—							
No. Bacterias x cc. orina	646,000						—							
Germen aislado	E. Coli						—							
(gram)	+++						—							
Leucocitos							—							
(mayor de 10 x c.)	++++						—							
Síntomas Ureterales	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	+	—	—	—	—	—	—
Tratamiento	A U R E O M I C I N A													



G R U P O No. 3

Caso No. 2

Día	20-V	21	22-V	23	24	25	27	28	29-V	30	31-V	1	2	3	4
Dilución	10 <sup>-6</sup>		10 <sup>-6</sup>						10 <sup>-6</sup>		10 <sup>-6</sup>				
	25		22						32		36				
	18		27						27		28				
	19		17						29		25				
	26		28						41		32				
	23		25						21		28				
Media	22.2		23.8						30		30.6				
Desv. Standard	7.1		4.41						7.34		3.43				
Coef. Variac.	31		18						24		11.2				
No. de Bacterias															
x cc. de orina	2'220,000		2'380,000						3'090,000		3'082,000				
Germe aislado	Píocianico		Píocianico						Kleb.		Kleb.				
Gram	+++		+++						+++		+++				
Leucocitos															
(mayor de 10 x c.)	+++		+++						+++		+++				
Síntomas	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+	+	+	+

S I G M A M I C I N A

*Conclusión:* El cuadro clínico y los hallazgos bacteriológicos de esta paciente demostraba un severo cuadro infeccioso ensombreciéndose aún más por la presencia de una pseudomona que sólo fue sensible a polimixiuria (sensible a 0.78 mgr.) y symamicina (sensible a 6.25 mgr.) siendo este último quien logró hacer desaparecer hasta el germen, logrando cambiar de la flora a otros gérmenes — que sólo daba discretas manifestaciones clínicas tanto que la paciente solicitó su alta, impidiéndonos seguir su evolución.

## GRUPO No. 3

## CASO No. 3

Día	5-V	6	7	8	9	10	12-V	13	14	15	16	17	18	19	20-V	21	22	23	24	25	26	27-V	
Dilución	10 <sup>-5</sup>					10 <sup>-2</sup>									10 <sup>-6</sup>								10 <sup>-6</sup>
	190					—									66								37
	192					—									90								32
	188					—									58								29
	184					—									60								35
	189					—									66								27
Media	188.6					—									68								32
Desv. Stand.	2.94					—									12.8								4.1
Coef. Variac.	15.5					—									18.8								12.8
No. de Bacterias																							
x cc. de orina	1'886,000														6'800,000								3'200,000
Germen aislado	Paracolon Coliformis					—									Protocus								Protocus
Gram	+++																						
Leucocitos																							
(mayor de 10 x c.)	—					+									±								±
Síntomas	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Tratamiento																							

FURADANTINA

FURADANTINA

FARMICETINA  
FURADANTINA

*Conclusión:* Paciente con cuadro clínico de infección urinaria que no presentaba piuria siendo su bacteriuria intensa, esta paciente recibió su cuadro infeccioso después del tratamiento con cambio de flora, lográndose confirmar posteriormente que esta rebelde infección estaba acondicionada por una rotación incompleta del riñón.

## GRUPO No. 3

## CASO No. 4

Día	20-IV	21	22	23	24	25-IV	26	27	28	29	31	1	2	3	4	5-V	6-V	7	8	9	10-V	11	12	13	14	15	16-V	17	18	19	20	21-V																
Dilución	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-5</sup>	231	261	225	148	180	165	190	251.2	27.12	11	2'510,000	E. Coli	++	++	++	++	+	+	+	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±													
Media										251.2	27.12	11	1'680,000	E. Coli	++	++	++	++	+	+	+	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±											
Desv. Standard										251.2	27.12	11	1'680,000	E. Coli	++	++	++	++	+	+	+	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±										
Coef. Variación										7.70	8.40	19.7																																				
No. de Bacterias x cc. orina										283.2	7.70	25.5	2'832,000	Kleb	+++	+++	+++	+++	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±									
Germen aislado										Kleb			Kleb	Kleb	++	++	++	++	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±									
Gram										+++			Kleb	Kleb	++	++	++	++	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±								
Leucocitos										+++			+++	+++	++	++	++	++	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±								
(mayor de 10 x c.)										+++			+++	+++	++	++	++	++	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±							
Síntomas Urinarios										±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±							
Tratamiento													BRISTACICLINA																																			

**Comentario:** Paciente que, a pesar de presentar discreta sintomatología urinaria, los hallazgos bacteriológicos confirmaron una intensa bacteriuria y piuria rebelde aún al tratamiento con Bristaciclina (sensibilidad en discos: 4 mm.) que obligó a una terapia más intensa con un antibiótico más efectivo (sensibilidad en disco 10 mm.)

## GRUPO No. 3

## CASO No. 5

Día	24-V	25	26	27	28	29-V	30	31	1	2	3	4	5	6	7-VI
Dilución	10-5					10-5									10-4
	121					78									12
	110					56									9
	114					62									10
	116					98									14
	119					81									10
Media	116					75									11
Desv. Standard	4.3					16.6									2
Coef. Variac.	37					22									18.1
Nº. Bacterias x cc. orina	1'660,000					750,000									11,000
Germen aislado	Proteus					Proteus									Proteus
Gram	+++					+++									+++
Leucocitos															
(mayor de 10 x campo)	+++					++									+++
Síntomas	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Tratamiento	CLOROMICETINA														
	CLOROMICETINA PENICILINA														

*Comentario:* Paciente en la cual una sonda permanente determinó un cuadro infeccioso urinario muy rebelde a pesar de dársele droga indicada por la prueba de sensibilidad pero como puede verse en los cuantitativos, éstos fueron disminuyendo progresivamente su cantidad.

## GRUPO No. 3

## Caso No. 6

Día	17-V	18	19	20	21	22-V	23	24	25	26	27-V	28	29	30	31	1	2	3	4	5-VI
Dilución	10 <sup>-4</sup>					10 <sup>-5</sup>					10 <sup>-2</sup>									10 <sup>-2</sup>
	35					208					--									--
	32					153					--									--
	34					193					--									--
	28					171					--									--
	31					167					--									--
Media	32					178					--									--
Desv. Standard	10.36					21.96					--									--
Coef. Variac.	32.3					12.3					--									--
Nº. Bacterias x cc. orina	3'200,000					1'780,000														
Germen aislado	E. Coli					E. Coli														
Gram	+++					+++														
Leucocitos																				
(mayor de 10 x c.)	+++					--					+									
Síntomas	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tratamiento	TETRACICLINA										FURADANTINA									

*Conclusion:* Paciente con cuadro clínico agudo cuya bacteriuria y piuria no cedió al tratamiento con Tetraciclina ins-  
talado sin realizar las pruebas de sensibilidad in vitro cuyos resultados posteriores determinaron una no-  
table resistencia, cediendo sólo bajo el tratamiento con drogas indicada en la prueba de sensibilidad.

## CONCLUSIONES

- 1.—Se hace un estudio sistemático de los diferentes métodos empleados en la cuantificación de bacterias y de sus factores de error, seleccionando al método del plaqueado como el que mejores condiciones ofrece para su aplicación a la clínica.
  - 2.—Se comprueba que los coeficientes de variación alcanzados por nosotros, empleando el método del plaqueado recomendado por Snyder, no presentan diferencias significativas con las de este autor.
  - 3.—Se comprueba que no existe una diferencia entre el Medio Mc Conkey y el medio utilizado por Snyder; recomendando su aplicación en la cuantificación de bacterias en la orina, cuando los factores de contaminación de las placas sean elevados o cuando se desee realizar determinaciones específicas de la flora gram negativa de la orina.
  - 4.—Se demuestra la necesidad imperiosa de utilizar el cultivo cuantitativo de orina para establecer una clara diferencia entre cultivos contaminados y verdadera bacteriuria; y además evaluar los resultados de la terapia antimicrobiana.
  - 5.—Se demuestra que una concentración mayor de 5,000 bact/ml., determina la positividad del gram a partir de una muestra de orina centrifugada y que, una concentración superior a 50,000 bact/ml. determina la positividad del Gram a partir de una muestra de orina sin centrifugar.
  - 6.—Se propone una sistemática de cuantificación de bacterias en la orina, con mínimos factores de error y fácilmente aplicable.
-



## BIBLIOGRAFIA

- 1.—ABELE C. A., 1939: "Results of bacterial plate counts of milk on three media and two temperatures of incubations" *Am. J. Pub. Health* 29; vol. 821.
- 2.—ADDIS Thomas, 1948: "Glomerular nephritis diagnosis and treatment", New York, The Macmillan Company.
- 3.—ANDERSON, J. A.; Fred, E. B. and Peterson, W. H., 1920: "The relation between the number of bacterial and acid production in the fermentation of xilose". *Jour. Inf. Dis.*, 27, Pág. 281-292.
- 4.—ANDERSON, E. H., and STUART, C. A., 1935: "A Quantitative diferencial method for counting mixed cultures of bacteria" *J. Bac.* 30 pag. 207.209.
- 5.—APPELBAUM, E. and LEEF A. 1948: "Occurrence of superinfection during antibiotic treatment" *J.A.M.A.* vol. 138 pag. 119.
- 6.—AYERS and MUDGE C. S. 1920: "Milk Ponder Agar for the determination of bacteria in milk" *J. Bact.* Vol. 1 pag 565 - 588.
- 7.—BALDWIN, A. D. and ROOT, H. F., 1940: "Infections of the upper urinary tract in the diabetic patient". *New Engl. J. Med.* pag. 223-244.
- 8.—BARNARD, D. M. STORY, R. D. and ROOT, H. F., 1953: "Urinary tract infections in diabetic women". *New Engl. J. Med.* pag. 248: 136-141.
- 9.—BEESON, P. 1955-56: "Factors in the pathogenesis of Pyelonephritis". *Yale Jour. of Biology and Med.* 28, pag. 81 - 104.
- 10.—BELL, E. T., 1950: "Renal disease". *Lea-Febriger* (second edition).
- 11.—BERMAN, L. B., SCHREINER, G. E. and FEY, J. O. "Observations on the Glitter cells fenomen". *New Engl. J. Med.* 1956, Vol. 255, pag. 989.
- 12.—BIRCHALL, R. & ALEXANDER, J., 1950: "Medical aspects of pyelonephritis". *Medicine*, 29: 1-30.
- 13.—BIRCALL, R. 1952: "Responsibility of Internist in treatment of pyelonephritis". *The Jour of Urology*", 68: 798.
- 14.—BREED, R. S., 1911: "The determination of the number of bacteria in milk by direct microscopical examination". *Centralbl. f. Bakt.* 11, Abt. 30, pag. 337-340.

- 15.—BREED, R. S., and DOTTERER, W. D., 1916: "The number of colonies allowable on satisfactory agar plates". *J. Bact.* 1: 321 - 331.
- 16.—BREW, J. D., 1914: "A comparison of microscopical method and the plate method of counting bacteria in milk" *N. Y. Agric. Expt. Sta., Bull.* 373, pag. 38.
- 17.—BRYER, M., 1955: "The Chemotherapy of bacterial Infections refractory to the Common antibiotics". *Ann. J. of Med.* 18: 782.
- 18.—BUTTERFIELD, C. T., 1932: "The selection of a dilution water for bacteriological examinations". *Jour. Bact.* 23, pag. 355-368.
- 19.—CAMPS, R., 1953: "Pyelonephritis e Hipertensión arterial. Estado actual del problema". *Rev. Med. de Chile.* 81 pag. 67.
- 20.—CARROL, 1955: "The changing flora in Urinary Infections in this antibiotic era". *Jour. of Urology.* 73, 609.
- 21.—CLABAUCH, G. F. and RHOADS, Paul S. 1957: "Efficacy of Urethral catheterization for determination of Urinary tract infection". Result with a new technique". *J.A.M.A.*, Oct. 19, vol. 165, Nº 7.
- 22.—COHEN, B., 1922: "Desinfection Studies. The Effects of temperature and hydrogen - ion concentration upon the viability of *Bact. coli* and *Bact. typhosum* in water". *Jour. Bact.*, 7, pag. 183-230.
- 23.—CONN, H. W., 1915: "Standards for determining the purity of milk" *Pub. Health Rept.*, 30, pag. 2349-2395.
- 24.—COOK, E. N., 1955: "The managements of the Infections of the Urinary Tract". *Ann. of Int. Med.* 43.316.
- 25.—COLEMAN, P. N. and TAYLOR, S., 1949: "Coliform infection of Urinary tract". *Jour. Clin. Pat.* 2 pag. 134-137.
- 26.—CRONE, P. B., 1948: "The counting of surface of bacterial" *Jour. Hyg. Camb.*). Vol. 46, pag. 426-430.
- 27.—DAVID SMITH, T., 1952: "The disturbance of normal bacterial ecology by the administration of antibiotic with the development of new clinical syndromes". *Ann. of Int. Med.* Vol. 37, pag. 1135.
- 28.—DEROW, H. A., 1942: "Diagnostic value of serial measurements of albuminuria in ambulatory patient". *New Eng. J. Med.* Vol. 227, pag. 827 - 829.
- 29.—DEROW, H. A., 1956 "Management of pyelonephritis" *New Engl. J. of Med.* vol. 255 Nº 7, pag. 337-342, Aug. 16.

- 30.—DIFCO MANUAL, 1952: Ninth Edition: "Difco Laboratories": Detroit 1, pag. 131-132.
- 31.—DUTTON, A. A. C., 1957: "Urinary tract infections in a Male Urological Ward". *The Lancet*, 1: 115.
- 32.—EISENBERG, G. M. ALEXANDER, J. D., Jr. and H. F., 1953: "Combined antibiotic therapy in refractory urinary tract infections". *J.A.M.A.* 152, pag. 1302-1304.
- 33.—ENGEL, W. J., 1956: "Recurring Urinary in children" *Medical Clinics of North America*. Vol. 39, pag. 965-974.
- 34.—FISCHER, Gerhardt Von, W. and LICH, W., 1957: "Über die Beurteilung der Pathogenität von Urinkeimen", *Deutsche Medizinische Wochenschrift*. Vol 82, Stutanger N° 10 pag. 346 - 348, 8 März.
- 35.—FISCHER, R. A., THORTON, H. G., and MACKENZIE, W. A., 1922. "The accuracy of the plating method of estimating the density of bacteriua populations: with special reference to the use o Thorton's agar medium with soil samples". *Ann. Appl Biol.*, 9, 325-359.
- 36.—FROBISHER, A., 1923: "A comparative study of media for quantitative estimation of bacteria in milk", *Amer. Jour. Public Health*. Vol. 13 pag. 474.
- 37.—FROZIER, and BOYER S., 1934: "A method for distinguishing living from dead cell of gramm-positive bacterial by staining preparations". *Jour. Bact.* vol. 27, pag. 31.
- 38.—GALESLOT. T. E., 1947: "Bepaling Van het Kiengetal van gepasteu riseerde melk met de rolculturmen Thode". *Met. Melk Zulveltijsche*. Vol. 2 pag. 201.
- 39.—GARROD, L. P., SHOTER, R. A., and CURWEN, M. P., 1954: "The results of chemoterapy in urinary infection". *Brit. Med. J.* 2, 1003 - 10008.
- 40.—GOLSTEIN, M., 1939: "Pathogenecity of cocci (micrococcus, stafilococcus aureus, and streptococcus faecalis) isolated from urine". *J. Urol.*, 41; 237-250.
- 41.—GLYNN, E., POWEL, M. REES. A. A., and COX, G. L., 1913: Standardization of bacterial vaccines" *Jour. Path. and Bact.*, 18, pag. 379 - 400.
- 42.—GUZE, Lucian B. and PAUL, B. Beeson, 1956: "Observations on the reability and safety of bladder catheterization for bacteriologic study of the urine". *New Engl. Jour. of Med.* 255, 474 - 475.

- 43.—HALKIER, E. HASNER, E. and SORENSEN, B. 1953: "The Importance of antibiotics in the treatment of Urinary Infections". Acta. Chir. Scandin. 104, 168.
- 44.—HARMSSEN, G. W., and VERWEEL H. J., 1936-37: "The influence of growth-promoting substances upon the determination of bacterial density by the platin method". Zentr. Bakt. Parasitenk, II. 95, 134-150.
- 45.—HARRISON, Hartwell J. and ORVILLE T. Bailey, 1942: "The significance of Necrotizing Phiclonephritis in Diabetes Mellitus". J.A.M.A.; Vol. 118, N<sup>o</sup> 1; Pag. 1.
- 46.—HARRISON, F. & FLIPPIN, 1955: "Evolution of water casting". The Jour. of Urol. vol. 43, pag. 638.
- 47.—HELMHOLZ, H. F., 1950: Determination of the bacterial content of the urethra: A new method, with results in a study of 82 men". J. Urol. Med. 6, 158.
- 48.—HENRICI, A. T., 1923: "Differential counting of living and dead cells of bacteria". Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 20, 293-295.
- 49.—HUNDLEY J. M., Jr. SIEGEL, I. A. HATCHEL, F. M. and DUMLER J. C. 1956: "Some physiological and pathological observation on urine". New. Eng. J. Med. 255, pag. 274-275.
- 50.—JACKSON, G. G. Dallembach F. D. and Kipnis, G. P., 1955: "Correlation of clinical and pathologic observations in the antibiotic era" Medical Clinics of North America, vol. 99, pag. 277-305.
- 50a.—JACKSON G. G. and GRIEBLE, H. G. "Pathogenesis of renal infection". Arch. of Int. Med. 1957, Vol. 100, pag. 692-700.
- 51.—JAMES, Norman, and SUTHERLAND, Marjorie, 1939: "The accuracy of the plating method for estimating the numbers of solid bacteria, actinomycensm and fungi in the dilution plated". Can. J. Research 17, pag. 72 - 86.
- 52.—JAWETZ, E., 1954: "Urinary tract infections" Disease-a-Month, Yearbook, Publ. Nov.
- 53.—JENNISON, M. W., 1935: "Some quantitative relationships in bacterial pro-pulation cycles". Jour. Bact. 30, pag. 603 - 623.
- 54.—JENNISON, Marshall W., 1937: "Relations between plate counts and direct microscopic counts of Escherichae Coli during the logarithmic growth period". J. Bact. 33, pag. 461-477.

- 55.—JENNISON, M. W. and WADSWORTH, George P., 1940: "Evaluation of the errors involved in estimating bacterial numbers by the plating method". *J. Bact.* 39, pag. 389-397.
- 56.—KASS, E. H., 1955: "Chemoterapeutic and antibiotic drugs in the management of infections of the urinary tract". *J. Amer. Med.* 18, 764.
- 57.—KASS, E. H., 1956 — "Asyntomatic Infection of the urinary tract". *Transaction of the Association of America Physicians*, vol. LXIX, pag. 56-63.
- 58.—KASS, Edward H. and LAWRENCE J. Schneiderman, 1957: "Entry of bacteria into the urinary tracts of patients with indwelling catheters". *New Engl. Jour. of Med.* 256: 556-557.
- 58b.—KASS, E. H., 1957: "Bacteriuria and the diagnosis of infections of the urinary tract" *Arch. of Int. Med.* Vol. 100 pag. 709-714.
- 59.—KEEFER, Chester S. D., 1957: "Pyelonephritis its Natural History and Course". *Bulletin the Johns Hopkins Hospital*. Vol. 100, Nº 3, pag. 107-131.
- 60.—KELLY, C. D. and RAHN, Otto, 1932: "The growth of individual Bacterial cells". *Jour. Bact.* vol. XXIII, Nº 2, pag. 147-153.
- 61.—KIRBY, W.M.M., CORPRON D. O. and TANNER, D. C., 1956. "Urinary tract infections caused by antibiotic resistant coliform basilli". *J.A.M.A.*, 162. Pág. 1-4.
- 62.—KNAYSI M. W., 1935: "A microscopic method of distinguishing dead from living bacterial cells", *Jour. Bact.* 30: 193-206.
- 63.—KNIGHT, J. DRAPPER, J. BRADY, E. A. and ATTMORE, C. A., 1952: Methenamine mandelate antimicrobial activity, absorption and excretion". *Antibiotic-Chemotherapeutic*, 2: 615.
- 64.—LAZARUS, J. A. and SCHWARZ, L. H., 1947: "Importance of procese bacteriologic data in treatment of infections of the urogenital tract". *Surgery*, 21: 713-719.
- 65.—LEISHMAN, A. W. D., 1939: "Bacillus Coli infection of the urinary tract. Its relation to bowel function". *The Lancet*, Vol. 2, pag. 971 - 973.
- 66.—LEVINE, M. and CREEVY, D. C., 1942: "Pathogenecity of staphilococci isolated from urine" *J. Urol.* 47: 515-521.
- 67.—LEVINE, B. S. and BLACK L. A., 1948: "Newly prosposed staining formulas for the direct microscopic examination of milk". *A.M.J. Pub. Health*, 38: 1210, b.

- 68.—LINNEWEN, F., 1957: "Zur klinik Der Harnwegosinfektionen":  
1) Wesen Und Bedeutung der Harnwegosinfektionen.  
2) Neue Kriterien Zur Diagnostik der Harnwegosinfektionen.  
3) Nierenfunktionstorungen bei Harnwegosinfektionen. Deutsche Med. Wochenschrift. vol. 82, pag. 369-348-499.
- 69.—LIPPMAN, R. W., 1952. "Urine and the Urinary sediment", Charles C. Thomas.  
1952.
- 70.—LONGCOPE, W. T., 1932. "Clinical feature of contracted kidney due to pyelonephritis". Bull. Johns Hopkins Hosp. 53, 255-287.
- 71.—LONGCOPE, W. T., 1937: "Cronical bilateral pyelonephritis: its origin and its association with hipertension". Ann. Int. Med. 11, pag. 149-163.
- 72.—LOGAN, G. B., 1949: "Urinary infection in children" Proc. Staff. Meet Mayo Clinic, vol. 24, pag. 562, Oct. 26.
- 73.—LOOPUYT, L., 1946: "Infections of the urinary tract. I. Frequency of urinary infections". Acta Med. Scand. 125-245.
- 74.—MALLORY, G. K., GRANE, A. R. and EDWARDS J. E., 1940: "Pathology of acute and of healed experimental pyelonephritis". Arch. Path. 30, 330.
- 75.—MALLMANN, W. L., BRYAN, C. S. and BATEN W. D., 1914: "A study of the microscopic examination of raw milk with suggest improvements". Jour. Milk. Technol. vol. 7, 315.
- 76.—McCLANE, C. M. and TROUT, H. F., 1937: "Relationships between infected urine and etiology of pyelitis in pregnancy". Am. J. Ob. and Gyn. 33, 828-834.
- 77.—MARPLE, C. D., 1941: "The frequency and character of urinary tract infections and unselected group of women". Ann. Int. Med. 14, 2220.
- 78.—McNEW, G. L., 1938: "Dispersion and growth of bacterial numbers by the plating method", J. Bact. 39: 387-401.
- 79.—MILES, A. A., MISRA, S. S. and IRWIN, J. O., 1938: The stimation of the bactericidal power of the blood". J. Hyg. 38, 732-749.
- 80.—MONGE CASSINELLI C., 1956: "Medios de diagnóstico de la pyelonefritis". Anales de la Facultad de Medicina. Tomo XXXLX Nº 2, Segundo Trimestre, pág. 554-557.
- 81.—MUDGE, C. S. and LAWLER, B. M., 1928: "It the statistical method applicable to the bacterial plate count". J. Bact. 15: 207-221.

- 82.—McGRADY M. H., 1955: "The numerical interpretation of fermentation of tube results". *Jour. of infections disease*. Vol. 29, 183-212.
- 83.—MACDONALD, R. A., LEVITIN, H., MAJORY, G. P. and KASS, E. H., 1957: "Relation between pyelonephritis and bacterial counts in urine. An autopsy with technical". Vol. 256, Nº 20. pag. 915-922.
- 84.—MESBIT, R. N. and DICK, V. S., 1940: "Acute staphillococcal infection of the kidney". *J. Urol.* 43: 623-636.
- 85.—NORTON, J. F. and SEYMOR M., 1926: "A study of media for the stimulation of bacterial in milk" *A. M. our Pub. Health* 16, 35-39.
- 86.—ORSKOV, I., 1954: "Nosocomial infections with klebsiela in lesions in the urinary tract". *II Act. Path. Microbial. Scand.* 35-149.
- 87.—ORSKOV, J., 1922: "Method for isolation of bacteria in pure culture from single cells and procedure for the direct tracing of bacterial growth on a solid medium". *Jour. Bact.* 7: 537-549.
- 88.—PARKER, D., 1954: "Treatment of urinary tract infection" *J.A.M.A.*, vol. 54; 922.
- 89.—PETERS, J. 1936: "Plavietes P. H. and ZIMMERMAN H. M.: "Pyelitis in toxemias of pregnancy". *Am. J. Obst. Gyn.* vol. 32; 911.
- 90.—PROUTY, C. C. BENDIZEN, H. A., and SWENSON, S. S., 1944: "A comparison of the rolls tube and standard plate method of making bacterial of counts of milk". *Jour. Milk Technol.* vo. 7: 5.
- 90A.—PHILPOT, D. B., 1956: "The bacterial flora of urine specimens from normal adults" *The J. of Urology*, vol. 75: 562-568.
- 90B.—POIRER, K. P. and JACKSON G. G., 1957: "Characteristics of leukocytes in the urine sediment in pyelonephritis, correlation with renal biopsy". *A.M. J. of Med.* Oct. pag. 579-586.
- 91.—RANTZ C. and KEEFER Ch. S.: 1940: "Sulfanilamide in treatment of infections of the urinary tract due to bacillus Coli". *Archives of Internal. Med.* vol. LXV: 933-956.
- 92.—RHOADS, P. S. and O'CONNOR, V. J., 1952: "Antibacterial management of urinary tract infections" *J.A.M.A.* vol. 148: 165-170.
- 93.—RUBI F., 1954: "Le diagnostique de pyelonephritis chronique". *L. D. Urologic.* vol. 6: 830.

- 94.—SALLE, A. T., 1957: "Bacteriología". Editorial Gustavo Gil S. A., Barcelona.
- 95.—SANJURJO, L. A. and FORTUÑO F., 1956: "Clinical and pathological study of pyelonephritis in Puerto Rico: Review of 2,800 autopsies and 1887 clinical records; America Association of genito-urinary surgeons. Vol. XLVIII. Pag. 35-43.
- 96.—SANDFORD, J. P., FAVOUR, C. B., MAO, F. H. and HARRISON, J. H. 1956: "Evaluation of the positive urine culture. An approach to the differentiation of significant bacteria from contaminants". Am. J. Med. 20, 88-93.
- 98.—SCHULTE, T., 1939: "Bacterioides and Anaerobic Streptococci in infections of the urinary. Report of a case". Proc. Staff. Meet Mayo Clin. XIV, pag. 536-538.
- 99.—SHACKMAN, R. and MESSENT, D., 1954: "The effect of and indwelling catheter on the bacteriology the male urethra and bladder". Brit. Med. 1, 2, 109.
- 100.—SHERMAN, J. M. and ALBUS, W. R., 1923: "Physiological youth in bacteria" 8: 127-139.
- 101.—SHERMAN, J. M. and ALBUS, W. R. 1924: "The function of lag in bacterial cultures" Jour. Bact. 9: 303-305.
- 102.—SHERMAN, J. M. and CAMERON, G. M., 1934: "Lethal environmental factors with the natural range of growth". Jour. Bact 27: 341-348.
- 103.—SOUSA, DE, SILVA, E. O. R., GAYOTTO F., CRUZ, D., 1954: "Comparative study between qualitative and quantitative urinary sediment". Pediat. Prat. 25, 2 pag. 59 - 68.
- 104.—SNYDER T. L., 1947: "The relative errors of bacteriological plate counting methods" July 31, Jour. Bact. vol. 54, 641-653.
- 104a—SNYDER, T. L., ENGLELY, F. B. Jr., PENFIELD, R. A. and CREASY, J. C. 1946. "A dilution plate counting method for certain strains of bacterium tularence" J. Bact. 52, pag. 241-242.
- 105.—STANSFELD, S. M., and WEBB, J. K., 1954: "Plea for longer treatment of chronic pyelonephritis in children". Brit. M. J. 1. 616-618.
- 106.—STERNHEIMER, R. and MALBIN, B. 1951: "Clinical recognition of pyelonephritis with a new stain for urinary sediment". Am. J. Med. II, 312-323.
- 107.—STORY, P. 1954: "Proteus infection in hospital" J. Path. Bact. 68, 55.



- 108.—SUTHERLAND, M., and JAMES, N., 1938: "The accuracy of the plate count of suspensions of pure cultures of bacteria in sterile soil" *Can. J. Research*, 16: 305-312.
- 109.—TOPLEY and WILSON'S, 1957: "Principes of bacteriology and Immunology" Fourth edition, Edward Arnold Ltd.
- 110.—TALLEDO E., 1956: Tesis de Bachiller. Facultad de Medicina. Lima.
- 111.—TANNER, F., 1948: "Practical Bacteriology", Second Edition New York, John Willy Soud Inc. London. Chapman Hall.
- 112.—WEISS, S. and PARKER, F. Jr., 1939: "Pyelonephritis its relation to vascular lesions and to arterial Hipertension". *Medicine* 18: N° 3, 222.
- 113.—WILSON, G. S., 1922: "The proportion of viable bacteria in young cultures, with special reference to the technique employed in counting". *Jour. Bact.* 7:405-446.
- 114.—WILSON, E. B., 1923: "The statistical significance of experimental date" *Science* 58: 93 - 100.
- 115.—WILSON, C. A. and BROOKE, 1927: "The viability of various species of bacteria in aqueous suspensions". *J. of Bact.* 22: 71:90.
- 116.—WILSON, P. M., and KULLMAN, E. D., 1931: "A statistical inquiry into methods for estimating numbers of Rhizobia". *Bact. Jour.* 13: 235-243.
- 117.—WOLLMAN, A. WEAVER, H., 1917: "A modification of the McCrady method of the numerical interpretation of germen tration - tube results". *Jour. Infect. Dis.* 21: 287-291.
- 117a—WHRIGHT y THORTON, 1927: "What exactitude there are in the count quantitative of plate". *Jour. Bact.* vol. 13, pag. 63.
- 118.—YALE, N. W., PEDERSON, C. S., and BREED R. S., 1933: "Temperature uniformiting in bacteriological incubators". *J. Bact.* vol. 33: 66.
- 119.—YEAN, R. C., 1940: "The effect of pH on the growth of bacterial in urine", *J. Urol.* vol. 44, pag. 699.
- 120.—YOW, E. M., 1952: "Development of proteus and pseudomonas infections during antibiotic therapy". *J. A. M. A.* 149: 1184 - 1188.
- 121.—WAUGH, 1952: "Elements of statistical method". Third. edition.
- 122.—ZIEGLER, N. R. and HALVORSON, H. O., 1935: "Application of statistics to problems in bacteriology. IV Experimental comparison of the dilution method, the plate count, and the direct count for the determination of bacterial population". *J. Bact.* 29, pag. 609-634.