

CENTRO PROVINCIAL DE HIGIENE Y EPIDEMIOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA  
GUANTANAMO

## EVALUACION DE AGAR UREA DE CHRISTENSEN MODIFICADO

*Dra. Lourdes M. Expósito Boué<sup>1</sup>, Téc. Ana Belkis Bott Croublet<sup>2</sup>, Lic. Marlene Drullet Pérez<sup>3</sup>, Téc. Exilda del Valle Arnaud.<sup>2</sup>*

### RESUMEN

El estudio se realiza en el laboratorio de Microbiología del Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología, con el objetivo de evaluar la reducción de la concentración de urea en el medio de cultivo Agar Urea de Christensen. Se confeccionan seis lotes del medio base adicionándole 4, 3, 2, 1, 0.5 y 0.25 ml de solución de urea estéril (SUE) al 40 %, respectivamente, y se realiza control de calidad y siembra de enterobacterias de forma concurrente con el medio de cultivo de referencia. Se elige para el diagnóstico confeccionar en medio de cultivo con 0.5 ml de SUE al 40 %. Con la aplicación de las fórmulas correspondientes, se determina la sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo y negativo, que informan sobre la correspondencia de los resultados, aplicando el medio de referencia y modificado. Se concluye que la fórmula modificada mantiene la calidad del diagnóstico y se ahorra el reactivo químico urea.

*Palabras clave:* MEDIOS DE CULTIVO, AGAR, UREA, INNOVACIÓN.

### INTRODUCCION

El medio de cultivo Agar Urea de Christensen es utilizado en la clasificación de los microorganismos que hidrolizan la urea y tiene como principio la determinación de la presencia o ausencia de la enzima ureasa, codificada por el material genético del cromosoma bacteriano.

El sustrato sobre el cual esta enzima actúa es la urea, que se incorpora al medio de cultivo como una solución de urea estéril (SUE) al 40 %, junto con un

---

<sup>1</sup> *Master en Enfermedades Infecciosas. Asistente.*

<sup>2</sup> *Técnica en Microbiología.*

<sup>3</sup> *Licenciada en Microbiología. Instructor.*

sistema indicador, el rojo fenol, que detecta el alza del pH al producirse amoníaco, detectándose la degradación del sustrato por cambio de coloración del medio a rosa intenso luego de la incubación.<sup>1-4</sup>

El deficiente abastecimiento de urea en ampulas listas para el uso, como el reactivo químico urea, afectaba el diagnóstico de las enterobacterias, microorganismos aislados con mucha frecuencia el laboratorio de microbiología clínica.

Partiendo de esta situación problema, se desarrolló la investigación, con el objetivo de reducir la concentración de urea en el medio de cultivo Agar Urea de Christensen y determinar la concertación mínima óptima de urea que mantuviera la calidad del diagnóstico, para no afectar los servicios médicos.

## METODO

El estudio se realiza en el Laboratorio de Microbiología del Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología de Guantánamo. El universo de estudio está formado por cuatro lotes de 55 tubos cada uno del medio en estudio, que es probado con 200 cepas de enterobacterias aisladas de diferentes muestras clínicas.

## TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO PARA LA OBTENCION DEL DATO PRIMARIO

### 1. Análisis de la formulación del medio de cultivo a modificar

A continuación se exponen las formulaciones del medio de cultivo de referencia y el modificado:

AGAR UREA DE CHRISTENSEN MEDIO DE REFERENCIA		AGAR UREA DE CHRISTENSEN MEDIO MODIFICADO	
Composición	g/L	Composición	g/L
Peptona	1.0	Peptona	1.0
Dextrosa	1.0	Dextrosa	1.0
Cloruro de sodio	5.0	Cloruro de sodio	5.0
Fosfato disódico	1.2	Fosfato disódico	1.2
Fosfato monopotásico	0.8	Fosfato monopotásico	0.8
Rojo fenol (0,2 %)	0.012 g (6 ml)	Rojo fenol (0.2 %)	0.012 g (6 ml)
Agar	15.0	Agar	15.0
pH 6,8 ± 0,2		pH 6.8 ± 0.2	
La base se esteriliza y se deja refrescar, adicionándole 5 ml de SUE al 40 %.		La base se esteriliza y se deja refrescar, adicionándole 0.5 ml de SUE al 40 %	

*Descripción:* el medio Agar Urea de Christensen es un medio sólido, se utiliza para detectar la presencia de la enzima ureasa, presente en muchas especies de microorganismos, que hidroliza la urea formando dióxido de carbono, agua y amoníaco, el cual reacciona en solución formando carbonato de amonio, ocurriendo una alcalinización del pH del medio. El indicador es el rojo fenol que se torna rosa en pH alcalino. Es una prueba cualitativa donde la positividad se evidencia en el cambio de coloración del medio de amarillo a rosa.<sup>4,5</sup>

Al analizar la fórmula del medio de cultivo se tiene que consta de una base compuesta por:

- Peptona y glucosa que promueven el desarrollo de los microorganismos.
- Cloruro de sodio, que proporciona la presión osmótica para el crecimiento de los microorganismos.
- Fosfato monopotásico y fosfato disódico, buffer que proporcionan un pH estándar de referencia.
- Rojo fenol, indicador de cualquier cambio de pH. El pH del medio de cultivo es de 6.8 y una vez confeccionado presenta color amarillo para ese valor de pH.
- Agar, responsable de la solidez del medio.

2-. Determinación de la concentración mínima óptima de SUE al 40 %.

Se confecciona el Medio Agar Urea de Christensen, adicionando 4, 3, 2, 1, 0.5 y 0.25 ml y el medio de referencia con 5 ml de la SUE al 40 %, respectivamente, a 100 mililitros de la base Agar Urea de Christensen.

Se estableció que la concentración mínima óptima sería aquella que produjera la cantidad suficiente de carbonato de amonio capaz de alcalinizar el medio de cultivo, provocando una subida de pH con el consiguiente cambio cualitativo de color en el medio de cultivo de amarillo a rosado intenso, y que la intensidad de la coloración sea comparable a la reacción que ocurre en el medio de referencia.<sup>6,7</sup>

3-. Control de la calidad <sup>8,9,10</sup>

Cada lote de medio preparado se sometió a ensayo para asegurar su aceptación y demostrar su actividad bacteriana, comprobando:

- Valor de pH, se confeccionó una papilla del medio listo para usar, en igual volumen de agua destilada y se midió el pH utilizando el pH-metro.

- Esterilidad: Se incubó el 5 % de lote confeccionado.
- Capacidad de crecimiento: Se inoculó cada medio de cultivo con las cepas normadas para el control de la calidad: control positivo, *proteus vulgaris*; control negativo, *Escherichia coli*.
- Estabilidad: Con cierta periodicidad, cuando el medio de cultivo no se agota rápidamente se repiten las pruebas anteriores para verificar si las condiciones de conservación son satisfactorias. En este caso no fue necesario porque cada lote del medio se agotó en pocos días

#### 4.- Siembra concurrente.

Utilizando 200 cepas de enterobacterias previamente identificadas, se realizó siembra concurrente utilizando el medio de referencia y los lotes confeccionados con 4, 3, 2, 1, 0.5 y 0.25 ml de SUE, para comparar resultados.

#### 5. Técnicas de análisis estadísticos<sup>11,12</sup>

Las 200 cepas de enterobacterias se sembraron de forma concurrente en el medio normado y modificado para comparar resultados y determinar:

- a) Confiabilidad o reproducibilidad: mide el nivel de concordancia entre pruebas repetidas.
- b) Validez (sensibilidad, especificidad) y rendimiento (valor predictivo positivo, negativo): se utilizan las fórmulas correspondientes para este fin y se confecciona una hoja de cálculo, donde se introducen los valores de las categorías siguientes:
  - Verdaderos positivos: La prueba normada y modificada son positivas.
  - Verdaderos negativos: La prueba normada y modificada son negativas.
  - Falsos positivos: La prueba normada es negativa y la modificada positiva.
  - Falsos negativos: La prueba normada es positiva y la modificada negativa.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Se diseñó e implementó el uso de la fórmula del Agar Urea de Christensen modificado, a la que se le realizaron diferentes ensayos para verificar y comprobar su efectividad.

Al realizar el control de calidad a los diferentes lotes de medios de cultivo, que se habían confeccionado adicionando diferentes cantidades de la solución de urea estéril al 40 %, se obtuvo:

1. El pH osciló entre 6.7 y 6.9, valores que se encuentran dentro del rango adecuado de variabilidad, que es de 6,6 a 7,0.
2. En el control de la esterilidad al incubar el 5 % de los tubos, no se obtuvo crecimiento bacteriano, lo que informa que la esterilización fue correcta y no existió contaminación del medio en el proceso de distribución y adición de la solución de urea al 40 % estéril.
3. La capacidad de crecimiento de las cepas control en el medio fue adecuada y se obtuvieron los resultados esperados con las diferentes cepas. Es decir:
  - Con E. coli, no productora de ureasa, el medio quedó de color amarillo, observándose que no hubo alteración en el pH.
  - Con P. mirabilis, gran productor de ureasa, todo el medio se tornó de color rosado intenso por un aumento del pH debido a la formación de gran cantidad de carbonato de amonio.

En la Tabla 1 se observan los diferentes lotes confeccionados del medio de cultivo y la cantidad de solución de urea al 40 % adicionada en cada caso, así como el resultado del control de calidad.

Los resultados de la siembra de forma concurrente de las 200 cepas de enterobacterias, utilizando el Agar Urea de Christensen de referencia y los lotes modificados con 4, 3, 2, 1, 0.5 y 0.25 ml de SUE al 40 %, fueron idénticos, es decir todos los lotes mostraron con una misma cepa, la misma reacción: cambios en la coloración del medio de amarillo a rosa intenso, con igual intensidad del color, en el caso de los positivos; No cambió de color en el caso de los negativos.<sup>6</sup>

Aunque en todos los lotes con diferentes concentraciones de urea, los resultados de control de calidad y de siembra concurrente fueron aptos e idénticos, se decide trabajar con el Agar Urea de Christensen modificado con

0.5 ml de SUE al 40 %, para un volumen final de medio de cultivo de 100 mililitros, quedando establecida la concentración mínima óptima de urea de 0.2 %, ya que se considera que con esta cantidad de urea, se obtienen buenos resultados y posibilita un ahorro considerable del reactivo, permitiendo trabajar con margen de seguridad.

Evaluación del Agar Urea de Christensen modificado.

1. Confiabilidad o reproducibilidad: la formulación modificada resultó reproducible, es decir existe concordancia en los resultados obtenidos en los diferentes lotes confeccionados del Agar Urea de Christensen modificado, lo que indica la estabilidad del medio diagnóstico.
2. Sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo y negativo: al determinar los verdaderos positivos y negativos, se encuentra que la reacción en el medio modificado estuvo en correspondencia total con el medio de referencia, por lo que no se registran falsos positivos y negativos.
3. La prueba de ureasa es muy utilizada en el diagnóstico de diferentes microorganismos, tales como levaduras, hongos, enterobacterias, *Helicobacter pylori*, entre otros.<sup>12-14</sup>

## CONCLUSIONES

Se reduce la concentración de urea en el medio Agar Urea de Christensen, identificando a esta como mínima óptima de urea, capaz de producir un cambio de color en el medio, que evidencia la presencia de la enzima ureasa.

El nuevo medio diagnóstico, es tan sensible y específico como el de referencia, ahorrándose urea y manteniendo los servicios microbiológicos a la población. No se encuentran reportes de estudios semejantes.

## RECOMENDACIONES

Es una formulación sencilla, práctica y económica, que ofrece idénticos resultados que la formulación de referencia, por lo que se recomienda su uso.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Koneman E, Allen SD, Dowell VR, Sommers HM. Diagnóstico microbiológico. México: Editorial Médica Panamericana; 1989.
2. Bridson EY. The Oxoid Manual. 8<sup>th</sup>ed. Inglaterra: Published by OXOID; 1998.
3. fda.gov [página web en internet]. Bacteriological Analytical Manual. Actualizada January 2001[citado: 23 sep 2009]. Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/.../ucm064558.htm>
4. Rodríguez Martínez C, Zhurbenko R. Manual de Medios de Cultivo. 2<sup>a</sup>ed. Centro Nacional de Biopreparados. La Habana: BioGen; 2001.
5. scribd.com [página web en internet]. Pruebas bioquímicas y fundamentos de microbiología. Actualizada Sep 2008[citado: 23 sep 2009]. Disponible en: [www.scribd.com/.../pruebas-bioquímicas-fundamentos-microbiología](http://www.scribd.com/.../pruebas-bioquímicas-fundamentos-microbiología)
6. Bott Croublet AB, Expósito Boué LM, Drullet Pérez M, Valle Arnaud E. Medio Agar Urea de Christensen modificado. Rev Latinoam Microbiol [serie en Internet]. 2002[citado: 24 abr 2008]; 44(supl.3):12-12. Disponible en: <http://iah.bmn.sld.cu/cgi-bin/wxis.exe/iah/?&IsisScript=iah%2Fiah.xis&nextAction=lnk&lang=E&base=cumed&expSearch=medio+and+de+and+cultivo+and+agar+and+urea>
7. Ramal N. Control de Calidad de los Medios de Cultivo utilizados en el Diagnóstico Microbiológico. La Habana: Ministerio de Salud Pública; 1990.
8. Organización Mundial de la Salud. Métodos Básicos de Laboratorios en Bacteriología Clínica. Ginebra: OMS; 1993.
9. Weng Alemán Z, Iglesias Fernández B, Abreu Orta M, Beltrán Díaz JR. Control de medios de cultivo con empleo de cepas bacterianas autóctonas como patrones secundarios de referencias. Rev Cubana Hig. Epidemiol [serie en Internet]. 2004[citado: 24 abr 2008]; 42(1). Disponible en: [http://bvs.sld.cu/revistas/hie/vol42\\_1\\_04/hie04104.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/hie/vol42_1_04/hie04104.htm)
10. Baryarre H, Hersford R. Metodología de la Investigación. La Habana: Editorial de Ciencias Médicas; 2004.
11. Baryarre H, Hersford R, Oliva M. Estadística descriptiva y estadística de salud. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2005.
12. serbi.luz [página web en Internet]. Fue mayor BA, Hernández RI, Paz MA, Cavazza ME, Lizarzol GM. Nuevas evidencias sobre la utilidad diagnóstica de una prueba de ureasa no comercial para la detección de la actividad de ureasa de *Helicobacter pylori* en biopsias gástricas. actualizado jun.2006. Disponible en: <http://www.serbi.luz.edu.ve/scielo.php?pid=S0075>

13. Castro ST, Rodríguez CR, Perazzi BE, Radice M, Paz Sticotti M, Muzio H, et al. Comparación de diferentes métodos para identificar las especies del género *Proteus*. Rev Argent Microbiol [serie en Internet]. 2006 [citado: 12 ago 2008]. Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S0325...sci>
  
14. Pérez C, Goitía K, Mata S, Hartung C, Colella M, Reyes H, et al. Utilización del caldo de urea de Stuart para el test de la ureasa: como prueba en el diagnóstico de las levaduras. Rev Soc Venez Microbiol [serie en Internet]. 2002 [citado : 23 sep 2009]; 22(2):136-140. Disponible en: <bases.bireme.br/cgi.../online/?... Urea>



**TABLA 1. AGAR UREA DE CHRISTENSEN DE REFERENCIA Y MODIFICADO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE UREA.**

MEDIO DE CULTIVO	ml DE SUE AL 40 % PARA 100 ML DE MC	g DE UREA EN 100 ML DE MC	% DE UREA EN EL MC	RESULTADOS DEL CONTROL DE CALIDAD
Agar Urea de Christensen de referencia	5	2	2	Apto
	4	1.6	1.6	Apto
	3	2	1.2	Apto
Lotes Agar Urea de Christensen con diferentes concentraciones de SUE al 40 %	2	0.8	0.8	Apto
	1	0.4	0.4	Apto
	0.5	0.2	0.2	Apto
	0.25	0.15	0.15	Apto

Leyenda:

ml: mililitros

MC: Medio de cultivo

**TABLA 2. ENTEROBACTERIAS IDENTIFICADAS UTILIZANDO CONCURRENTEMENTE LOS LOTES DEL AGAR UREA DE CHRISTENSEN NORMADO Y MODIFICADO.**

MICROORGANISMO	UREASA POSITIVA	UREASA NEGATIVA	TOTAL
<i>Escherichia coli</i>	-	46	46
<i>Enterobacter aerogenes</i>	6	20	26
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	33	43
<i>Proteus mirabilis</i>	33	0	33
<i>Citrobacter freundii</i>	-	17	17
<i>Salmonella spp</i>	-	23	23
<i>Shigella spp</i>	-	12	12
<b>TOTAL</b>	<b>49</b>	<b>151</b>	<b>200</b>