ABEL GUTIERREZ RAMOS

INVESTIGACION DIAGNOSTICA

LABORATORIO DE REACTIVOS PARA DIAGNÓSTICO

MULTIBAC I.D.

Instructivo

INTRODUCCIÓN

El estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínica. Su realización se desarrolla mediante las pruebas de sensibilidad o **Antibiograma**, cuyo principal objetivo es la evaluación en el laboratorio de un microorganismo frente a uno o varios antimicrobianos, traduciendo, en una primera aproximación, su sensibilidad al mismo como una predicción de su eficacia clínica. El **Antibiograma** define la actividad ***in vitro*** de un antibiótico frente a un microorganismo determinado y manifiesta su capacidad para inhibir el crecimiento de una población bacteriana. Por consiguiente, ofrece en su conjunto, elementos objetivos de actuación en los tratamientos empíricos. El panorama actual de las resistencias de los microorganismos a los antimicrobianos hace ineludible su determinación, incluso en aquellos casos en los que la sensibilidad se considera universal y no se han descrito (por el momento) mecanismos de resistencia. Los ensayos de sensibilidad han de estar convenientemente normalizados y sujetos a procesos de control que aseguren su reproducibilidad. Para efectos de reproducibilidad y practica rutinaria, las pruebas semicuantitativas de difusión en agar nos brindan la información suficiente para la elección y seguimiento del tratamiento con antimicrobianos.

El **Antibiograma** está indicado cuando se aísla una bacteria responsable de un proceso infeccioso y no puede predecirse su sensibilidad, especialmente si se sabe que este tipo de bacteria puede presentar resistencia a los antimicrobianos usados más comúnmente.

El método de difusión en agar es fácil de realizar, rápido y barato. Es una metodología aplicable a una amplia variedad de bacterias, fundamentalmente bacterias aerobias de crecimiento rápido como: *Enterobacteriaceae., Pseudomonas sp., Staphylococcus sp., Enterococcus sp., Acinetobacter sp.*, etc.

FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

El **Antibiograma** por la técnica de difusión en agar (disco-placa) basado en las investigaciones de Bauer-Kirby y colaboradores, es uno de los métodos que el National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. El **Antibiograma** disco-placa consiste en depositar, en la superficie de agar de una caja petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas de 18 a 24 horas de incubación, los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. La concentración del antibiótico en la interfase entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida por métodos de dilución.

MÉTODO

Medios, materiales y equipo necesario:

- Medio de cultivo Mueller-Hinton Agar.
- Solución salina isotónica estéril.
- Tubos de ensaye estériles.
- Hisopos de algodón, estériles.
- Cajas de petri estériles.
- Pinzas de disección.
- Multidiscos o sensidiscos conteniendo la concentración adecuada de antimicrobiano.

PROCEDIMIENTO

1. Preparación del inóculo: recoger con un asa microbiológica de 3 a 5 colonias iguales de la placa de cultivo de 18 a 24 horas y sembrarlas en 5 ml. de medio líquido (Infusión cerebro-corazón. Caldo Todd Hewitt, Caldo soya tripticasa, etc.) e incubar a 35º C durante 2 a 6 horas hasta conseguir o superar una turbidez del 0.5 de la escala de MacFarland. Si la turbidez es superior, se realiza el ajuste necesario con solución salina estéril.
   El estándar de sulfato de bario de MacFarland, se prepara mezclando: -0.5 ml. de Cloruro de bario 0.048 M. (1.175% peso/volumen de Cloruro de bario dihidratado con: 99.5 ml. de H_2SO_4 al 1% v/v (0.36 N.) Esto es la mitad de la densidad del tubo no.1 de MacFarland y se denomina 0.5 de MacFarland.
2. Preparar el medio de Mueller-Hinton agar y depositar aproximadamente 25 ml. del medio sobre las cajas de petri estériles de 90 mm de diámetro (si las cajas fuesen de mayor diámetro, calcular el volumen necesario para obtener un grosor de la placa de agar de aproximadamente 4 mm). Las placas pueden guardarse en refrigeración hasta su uso debiendo tener la precaución de que no almacenen agua de condensación. Para microorganismos exigentes, se puede adicionar al medio sangre de carnero desfibrinada estéril al 5%.
3. Antes de que transcurran 15 minutos de haber ajustado el inóculo, introducir un hisopo de algodón estéril dentro de la suspensión y al retirarlo rotar varias veces contra la pared del tubo por encima del nivel del líquido con la finalidad de eliminar el exceso de inóculo.
4. Inocular las placas de Mueller-Hinton agar completamente, sin dejar ninguna zona libre. Esto se consigue deslizando el hisopo por la superficie del agar tres veces, rotando la placa unos 60º cada vez y pasándola por último por la periferia del agar para conseguir una siembra uniforme. Dejar secar de 3 a 5 minutos antes de colocar los discos.
5. Colocar los discos con dispensadores o manualmente con pinzas estériles. Debe asegurarse que contacten perfectamente con la superficie del agar, por lo que deben presionarse ligeramente sobre la superficie del agar. No deben situarse a menos de 15 mm del borde de la placa, y han de estar distribuidos de forma que no se produzca superposición de los halos de inhibición.
6. Incubar las placas invertidas a 35º C en atmósfera aeróbica antes de que transcurran 15 minutos. Las placas se incubarán 16-18 horas.

LECTURA DE LOS RESULTADOS

Después de 18 horas de incubación, leer el diámetro de las zonas completas de inhibición con una regla. Las zonas de los medios transparentes se miden sobre el reverso de la placa y los medios que contienen sangre, sobre la superficie del agar.

Cuando aparecen colonias dentro del halo de inhibición, puede tratarse de mutantes resistentes, contaminaciones, poblaciones heterogéneas o cultivos mixtos y conviene volver a identificarlas y realizar otra vez el ensayo de sensibilidad antimicrobiana.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Comparando los diámetros del halo de inhibición con las CMIs, y estableciendo las correspondientes rectas de regresión, se han fijado unos criterios para clasificar las cepas estudiadas. De esta forma se han fijado tres categorías: Sensible (S), Intermedia (I) y Resistentes (R). Anteriormente se añadía la categoría Moderadamente Sensible (MS) que tiende a eliminarse y los resultados correspondientes a la misma se han situado en la categoría de intermedia. Las interpretaciones seguirán las normas establecidas por el NCCLS, pero, por regla general, un diámetro de inhibición de 30 a 35 mm es indicativo de una cepa altamente sensible, mientras que diámetros de zona de inhibición inferiores a 15 mm son los que presentan las cepas resistentes.

- **Sensible**. Indica que la infección ocasionada por la cepa para la que se ha determinado la CMI o su correspondiente halo de inhibición puede tratarse de forma adecuada empleando las dosis habituales del antimicrobiano.
- **Intermedio**. Indica que el halo traducido en valores de CMI se aproxima a las concentraciones de antimicrobiano alcanzables en sangre y que puede esperarse eficacia clínica en aquellas localizaciones en que se alcanzan altas concentraciones de antimicrobiano (P. Ej. Orina) o cuando se emplean dosis mas elevadas de lo habitual.
- **Resistente**. Se refiere a aquellos microorganismos que no se inhiben por las concentraciones habitualmente alcanzadas en sangre/tejidos del correspondiente antimicrobiano, o a aquellos microorganismos en los que existen mecanismos de resistencia específicos para el agente estudiado.

Tabla de comparación de halos de sensibilidad en mm (NCCLS)

Clave	– antibiótico	Concentración	R Igual o menor	I Entre	S Igual o mayor
(AK)	Amikacina	30 mcg	14	15-16	17
(AM)	Ampicilina	10 mcg			
	Enterobacteriaceae		11	12-13	14
	Staphylococcus sp.		28	----	29
	Enterococos		16	----	18
	Estreptococos		21	----	30
(CB)	Carbenicilina	100 mcg			
	Enterobacteriaceae		18	18-22	23
	Pseudomonas sp.		13	14-16	17
(CF)	Cefalotina	30 mcg	14	15-17	18
(CFX)	Cefotaxima	30 mcg	14	----	23
(CTZ)	Ceftazidima	30 mcg	14	15-17	18
(CTX)	Ceftriaxona	30 mcg	13	----	21
(CXM)	Cefuroxima	30 mcg	14	15-17	18
(CPF)	Ciprofloxacina	5 mcg	15	16-20	21
(CLM)	Clindamicina	30 mcg	14	15-20	21
(CL)	Cloranfenicol	30 mcg	12	13-17	18
(DC)	Dicloxacilina	1 mcg	--	----	--
	Staphylococcus sp.		10	11-12	13
(ENX)	Enoxacina	10 mcg	14	15-17	18
(E)	Eritromicina	15 mcg	13	14-17	18
(GE)	Gentamicina	10 mcg	12	13-14	15
(NET)	Netilmicina	30 mcg	12	13-14	15
(NF)	Nitrofurantoína	300 mcg	14	15-16	17
(NOF)	Norfloxacina	10 mcg	12	13-16	17
(PE)	Penicilina	10 U			
	Enterococos		14	----	15
	Estreptococos		19	20-27	28
	Staphylococcus sp.		28	----	29
	N. gonorrhoeae		19	----	20
	Neumococos		19	----	20
(SXT)	Sulfametoxazol Trimetroprim	25 mcg	10	11-15	16
(TE)	Tetraciclina	30 mcg	14	15-18	19
(VA)	Vancomicina	30 mcg	--	----	--
	Enterococos		14	15-16	17
	Staphylococcus aureus		--	----	15

Notas al procedimiento

Se recomienda utilizar el método de suspensión directa de colonias para el estudio de microorganismos de crecimiento difícil en medios líquidos (*Haemophilus sp., N. gonorrhoeae, S. pneumonie, Estreptococos* que no sean *Enterococos, Listeria, Moraxella* y *Corynebacterium sp.*) y para estafilococos en los que se quiera detectar la resistencia a oxacilina.

- **Método de suspensión directa de colonias**: A partir de una placa de cultivo de 18 a 24 horas de incubación recoger varias colonias con un asa bacteriológica y ajustar el inóculo a una turbidez equivalente al 0.5 de MacFarland en solución salina isotónica estéril. Agitar en un agitador " Vortex" durante 15-20 segundos. Continuar con el paso no.2.

Control de calidad

Es necesario emplear cepas control para supervisar la exactitud y fiabilidad de la metodología:

- *Staphylococcus aureus* ATCC-25923
- *Escherichia coli* ATCC-25922

debido también al gran número de variables que pueden afectar los resultados como son:

- Indebida preparación del inóculo.
- Indebida preparación del medio Mueller-Hinton agar.
- Tiempo ente la preparación del inóculo y la siembra del medio de cultivo.
- Exceso de inóculo
- Deshidratación del medio de cultivo.
- Cepas mixtas en estudio.
- Interpretación de los halos de inhibición.
- Tiempo de lectura después de 18 horas de incubación.

Bibliografía

- Calderón Jaimes Ernesto. *Aplicación Clínica de Antibióticos y Quimioterapeúticos.* Méndez Editores, S.A. de C.V. México. 2000.
- Jorgensen JH, Ferraro MJ. *Antimicrobial susceptibility testing. General principles and contemporary practices.* Clin Infect Dis 1998; 26: 973-980.
- Miller LA, Rittenhouse SF., Utrup LJ, Poupard JA. C*omparasion of three methods of determination of a single MIC and antimicrobial agent.* J Clin Microbiol 1994;32: 1373-1375.
- Amsterdam D. *Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media.* En: Lorian V (ed): Antibiotics in laboratory medicine. 4ª ed. 1996 Pp. 52-111.

Hecho en México por: Investigación Diagnóstica y/o Gutiérrez Ramos Abel
Macedonio Valdez Mz. 22 Lote 17 Col. Las Peñas, Iztapalapa C.P. 09750 México, D.F.
Tel/Fax 5693 4995
5691 8998 • 5642 9216
www.idlab.com.mx

REG. No.1159R2002 SSA.