

PROCESAMIENTO DE CEPAS PARA REALIZAR EL ANTIBIOGRAMA

Autor

Lic. Neima Llanes Rodríguez

Departamento

Microbiología

CONTENIDO

- Método de Kirby-Bauer.

INTRODUCCIÓN

Varios métodos de laboratorio pueden ser usados para determinar "in vitro" la susceptibilidad de bacterias ante agentes antimicrobianos. En muchos laboratorios de microbiología clínica, la prueba de difusión en agar es usada en forma rutinaria para bacterias de rápido crecimiento y algunas bacterias fastidiosas patógenas.

El método que actualmente recomienda el Sub Comité de Ensayos de Susceptibilidad del Laboratorio Internacional de Referencia (National Committee for Clinical Laboratory Standards o NCCLS), está basado por el método originalmente descrito por Bauer *et al.*, (Método de Kirby-Bauer). Este es el método de difusión en disco en que se han desarrollado estándares para su interpretación y está apoyado por datos clínicos y de laboratorio.

EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

Equipos

- Incubadora a 35⁰C
- Estereoscopio
- Refrigerador doméstico

Materiales

- Aplicadores de algodón
- Lápiz cristalográfico
- Asas de nitrógeno
- Pinzas y agujas de inoculación
- Placas de Petri
- Tubos de 13 x 100 con tapa de rosca estériles
- Tubos de 13 x 100 sin tapa de rosca estériles

- Alcohol 90 %
- Regla graduada en mm
- Cepas ATCC de control

Reactivos

- Medio de Agar Müller Hinton
- Caldo Müller Hinton
- Discos de antibiótico

Estándar de turbidez para preparación del inóculo

Para estandarizar la densidad del inóculo para una prueba de susceptibilidad, se utiliza estándar de turbidez de BaSO_4 equivalente a un estándar 0.5 McFarland o su equivalente óptico. El cual está compuesto por una solución de 0,5 mL de la solución $\text{BaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ al 1,175 % (p/v) en 99,5 mL de una solución de ácido sulfúrico 1 %. El mismo se puede conservar durante 6 meses a la temperatura ambiente, en la oscuridad y herméticamente cerrado.

Objetivos

- Conocer la sensibilidad *in vitro* de un determinado germen aislado a un grupo de discos de antibióticos.

Alcance

- Se le realizará a todas las cepas que se les desee conocer su patrón de susceptibilidad antibiótica, las cuales serán todos los gérmenes aislados como patógenos de muestras clínicas.

Responsabilidades

- Técnico que trabaja las muestras y profesional que atiende el trabajo de ese cubículo.

Condiciones de bioseguridad

- Ver manual de bioseguridad del laboratorio.

Operaciones preliminares

- Los gérmenes que se van a trabajar en esta sección deben ser previamente identificados como Gram positivos o Gram negativos y se enviarán a dicha sección en cultivo puro, libre de contaminaciones, y con una rotulación según el número de entrada y el tipo de muestra.
- Los medios de cultivo en este caso son el Agar Müller Hinton y el caldo Müller Hinton, los cuales se prepararan en la sección de Medios de cultivo. El Agar Müller Hinton debe ser preparado como mínimo con un día de antelación para un mejor secado de las placas.

Procedimiento

Preparación del inóculo

- ***Método de crecimiento***

- ⊞ Al menos 3 a 5 colonias bien aisladas y del mismo tipo de morfología se seleccionan de un agar de cultivo. Se toca la colonia por arriba con un asa y el crecimiento se transfiere a un tubo con 4 a 5 mL de un medio de cultivo adecuado, tal como caldo Müller-Hinton.
- ⊞ El caldo de cultivo es incubado a 36°C hasta que alcance la turbidez del estándar de 0.5 McFarland (usualmente 2 a 6 horas). Esto resulta en una suspensión que contiene aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UCF/mL.
- ⊞ La turbidez del caldo se ajusta con solución salina estéril o con caldo para obtener una turbidez ópticamente comparable a un estándar de 0,5 McFarland.

Inoculación de las placas

- En un lapso de tiempo óptimo de 15 minutos después de ajustar la turbidez de la suspensión del inóculo, un aplicador de algodón se sumerge en ella. El aplicador debe ser rotado varias veces y presionado firmemente contra la pared interna del tubo sobre el nivel de líquido. Esto remueve el exceso de inóculo.
- Se inocula la superficie de una placa de Agar Mueller–Hinton extendiendo el aplicador de un extremo a otro sobre toda la superficie. Este procedimiento es repetido dos o más veces, rotando la placa aproximadamente 60° C después de cada aplicación para asegurar una distribución constante del inóculo. Como paso final se pasa sobre los bordes del Agar.
- La tapas de la placa pueden quedar entreabiertas por 3 a 5 minutos, pero no más de 15, para permitir que un exceso de humedad de la superficie se absorba antes de aplicar el disco con la droga impregnada.
- Se debe evitar excesos en la densidad del inóculo. Nunca usar caldos de cultivo de la noche anterior sin diluir u otro inóculo no estandarizado.

Aplicación de los discos a las placas inoculadas

- Los discos se dispensan sobre la superficie del agar. Cada disco debe ser presionado para asegurar contacto pleno con la superficie del agar. Ya sea que el disco se ponga individualmente o con un dispensador, deben ser distribuidos en forma constante y no debe quedar a menos de 24 mm de distancia entre centros. No más de 12 discos se deben poner por placa de 150 mm o no más de 5 en placas de 100 mm. Debido a que algunas drogas difunden casi instantáneamente, un disco no debe ser relocalizado una vez que haya tomado contacto con la superficie del agar.
- Las placas son invertidas y puestas en un incubador a 36°C en el lapso de 15 minutos después de aplicados los discos. Las placas no se deben incubar

en un ambiente de CO₂ porque los estándares de interpretación fueron desarrollados usando aire ambiente y el CO₂ alterará significativamente el tamaño de las zonas de inhibición de algunos agentes.

Los discos utilizados en este proceder estarán directamente relacionados con el tipo de bacteria a la cual se le esté midiendo la sensibilidad, es decir, si se trata de bacterias Gram negativas o Gram positivas, de la localización de la infección, de la procedencia del paciente al que se le tomo la muestra microbiológica, ya sea ambulatorio u hospitalizado y dentro de estos si se trata de una unidad de cuidados especiales, una sala abierta, etc. Además se seleccionarán los antibióticos que representen a cada uno de los grupos de antimicrobianos que se utilizan en la actividad asistencial.

Lectura de las placas e interpretación de los resultados

- Después de 16 a 18 horas de incubación, cada placa es examinada. Las zonas de inhibición resultantes deben ser uniformemente circulares en una capa homogénea de crecimiento. Si aparecen colonias individuales, el inóculo estaba muy diluido y la prueba debe ser repetida. Los diámetros de la zona de inhibición completa son medidos en mm pasando por el centro del disco. La placa petri se mantiene a una distancia de pocos centímetros sobre un fondo negro no reflectante y se ilumina con luz reflejada. Si se agregó sangre al agar base (como para *Streptococcus*), las zonas son medidas en la superficie superior del agar iluminado con luz reflejada sacando la tapa. Si el organismo de prueba es un *Staphylococcus* spp. o *Enterococcus* spp., se requieren 24 horas de incubación y luz transmitida (placa se mantiene hacia la luz) se usa para examinar la zona de oxacilina y la zona de vancomicina buscando ligeros desarrollos de colonias resistentes a meticilina o vancomicina.
- El margen de las zonas debe ser tomado como el área donde no se observa crecimiento visible. Un crecimiento pobre de pequeñas colonias, las que se detectan con lente de aumento al borde de la zona de crecimiento inhibido, son ignoradas. Sin embargo, colonias discretas creciendo dentro de la zona clara de inhibición deben ser identificadas y probadas nuevamente. Con *Proteus* spp., el delgado velo de población en una obvia zona de inhibición debe ser ignorado. Con trimetoprim y las sulfonamidas, pueden aparecer zonas de crecimiento leve; por lo tanto, no se considera y se mide los márgenes más obvios para determinar el diámetro de la zona. Cuando se usa medio suplementado con sangre para probar *Streptococcus* spp., se debe ser cuidadoso en medir la zona de inhibición y no la de hemólisis.
- Los tamaños de las zonas de inhibición son interpretados en las Tablas NCLI para ser informado como susceptible, intermedio, o resistente a los antimicrobianos que se han probado, estas tablas deben ser actualizadas periódicamente.

Interpretación de los resultados de la prueba de difusión en disco

Categorías interpretativas

- **Sensible:** La categoría "sensible" implica que una infección debido a una cepa puede ser apropiadamente tratada con la dosis de agente antimicrobiano recomendado para ese tipo de infección y especie infectante.
- **Intermedio:** La categoría "Intermedio" incluye aislamientos con agentes antimicrobianos con una concentración mínima inhibitoria (CMI) que se aproxime usualmente a nivel de tejido y sangre disponible y para los cuales su velocidad de respuesta puede ser más lenta que la de los aislamientos susceptibles. La categoría "Intermedia" implica eficacia clínica en sitios del cuerpo donde la droga es fisiológicamente concentrada; ejemplo, quinolonas y β -lactámicos en orina; o cuando una dosis mayor que lo normal de una droga puede ser usada; ejemplo: β -lactámicos.
- **Resistente:** Las cepas resistentes no son inhibidas por la concentración sistémica usualmente alcanzable de un agente cuando los esquemas de dosificación normal son usados. Pueden tener CMI que caen dentro del rango donde están disponibles mecanismos de resistencia específicos (por ej. β -lactámicos) y la eficacia clínica no ha sido confiable en tratamientos estudiados.

Lectura

1. Con una regla de doble decímetro se medirá el diámetro de los halos de inhibición de crecimiento alrededor de los discos, estos deben ser medidos por el fondo de la placa y se anotaran los resultados, los cuales serán comparados con las tablas correspondientes. Se interpretará como sensible, resistente o intermedio. El borde de la zona de inhibición se aprecia a simple vista y es en general netamente delimitado. Sin embargo hay 3 excepciones:
 - ⊕ En el caso de las sulfamidas y el clotrimoxazol, pequeñas colonias pueden aparecer en el interior de la zona de inhibición, las mismas no deben ser tomadas en cuenta.
 - ⊕ Cuando se estudia sensibilidad a la penicilina de los estafilococos productores de Penicilinas se observa en la zona de inhibición un borde que indica dilatación marcada estas se reconocen con facilidad cuando se comparan con las cepas testigos, cualquiera que sea el tamaño debe ser considerada como reveladora de resistencia.
 - ⊕ Ciertas cepas de *Proteus* pueden dispersarse en el interior de las zonas de inhibición lo cual no debe ser tomado en cuenta.

Controles

Todo proceso técnico lleva implícito un Control de Calidad; el Método de Kirby Bawer se le realiza a través de cepas de referencia las cuales deben dar determinados halos de inhibición con un grupo de antibióticos, para esto se utiliza como referencia una tabla de la NCLI actualizada, la cual recomienda el empleo

de las cepas ATCC *Escherichia coli* 25922, *Escherichia coli* 35218, el *Staphylococcus aureus* 25923 y la *Pseudomonas aeruginosa* 27853.

Este control debe realizarse cada vez que se empiece a utilizar un nuevo lote de discos de antibiograma y periódicamente una vez al mes para un control del proceso.

Observaciones

2. En este acápite queremos mencionar y referirnos en el caso que queramos aplicar el método de Kirby-Bauer en organismos fastidiosos la necesidad de tener en cuenta algunos requerimientos especiales.
3. Para los antibiogramas de los *Streptococos* se utilizan placas de Agar Sangre de carnero y en el caso de las *Neisserias* los mismos se realizan en Agar Chocolate y la interpretación de los resultados se busca en las tablas correspondientes.

Bibliografía consultada

1. A guide to sensitivity testing. Profesor Y Phillips UMDS.
2. Arash G et al. J of Virology 67, 1385-1395 (1993)
3. Bonifaz, A. Micología Médica Básica II edición. 2000.
4. Botero D y cols. Parasitosis humana. 3ra Edición. Colombia. 1999
5. Catalogo de Medios de cultivo del Biocent (1995)
6. Catalogo de Medios de cultivos de la OXOID (1991)
7. Control de qualite 15 - 17. Guide pour L' Antibioگرامe 1979.
8. Engvall, E Perlmann, P. Enzyme linked inmunosorbent assay (ELISA). III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-inmunoglobulin in antigen coated tubes, J. Inmunol. 109, 129-135 (1988).
9. García-Rodríguez, J A, Picazo, J J: Microbiología Médica. Editorial Mosby. Madrid. España. 1996.
10. Henry JB. Clinical Diagnosis and manegement by laboratory Methods. Philadelphia: WB Saunder. 1979; vol 2: 1866-1867.
11. Jawetz E y col. Manual de Microbiología Médica. Edit Manual Moderno. XVII Edición. México DF. 2001.
12. Kolleman y cols. Manual de Procedimientos Microbiológicos. 2002.
13. Kourí P, Sotolongo F y cols. Manual de Parasitología y Helmintología humana. La Habana. 1982.
14. Llop Hernández y col. Microbiología y Parasitología Médicas. Editorial Ciencias Médicas. La Habana. Cuba. 2001
15. López Martínez R. Y colaboradores. Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio. 1995
16. Manual del sistema API y catálogo del API.
17. Manual de trabajo del equipo SUMA procedente del Centro Nacional de Inmunoensayos.
18. Manual VIDAS. BioMérieux. Disponible en: <http://www.biomerieux.com>. Acceso 25 de septiembre de 2008.
19. Marchas técnicas de Microbiología. 1995.
20. Marrero AL y cols. Programa Nacional de Control de Tuberculosis. Ciudad Habana. 1999.
21. Methode modifiee de Kirby Bawer. pag 9-15. 1979.
22. Murray y cols. Microbiología Médica. 2002.
23. OMS. Métodos básicos de laboratorio de Parasitología Médica. Ginebra.1992.

24. Performance standars for antimicrobial susceptibility testing. ag 07 1992. NCCLS Document M100 - s4.
25. Suarez Moreno O. Manual técnico de la baciloscopia de la Lepra. Instituto de Medicina Tropical. Cuba 2000..