

36 | Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica

R. Taroco, V. Seija, R. Vignoli

El estudio de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínica. Dentro de los beneficios que presenta se encuentran:

- Dirigir la terapéutica una vez que el germen es conocido
- Generar una base de datos que permita seleccionar los antibióticos a utilizar en un tratamiento empírico (aquel en que no conocemos el agente causal)
- Desarrollar políticas de uso de antimicrobianos
- Vigilar la aparición de nuevos mecanismos de resistencia
- Detectar precozmente la diseminación epidémica de una cepa, tanto a nivel hospitalario como comunitario

Pero la determinación de la sensibilidad a antimicrobianos no implica solo realizar un conjunto de técnicas y medir los resultados. Es necesario saber interpretar los mismos y darles el significado que realmente tienen. Entre el médico clínico que tiene en sus manos un paciente, y el microbiólogo que entre las suyas tiene las placas con el microorganismo responsable de una infección, debe haber buena comunicación, lo cual implica hablar el mismo idioma. Los parámetros que determinan los resultados de sensibilidad o resistencia, cada vez más involucran información proveniente de ambos lados: el paciente y el microorganismo.

En el capítulo 34 se consideraron las características farmacocinéticas y farmacodinámicas para los principales grupos de antibióticos, y en el 35, las diferentes estrategias bacterianas de supervivencia. En este capítulo intentaremos desarrollar los diferentes métodos de estudio y las bases de la interpretación de los resultados obtenidos *in vitro*.

Clasificación

Estos métodos pueden clasificarse en métodos cuantitativos y cualitativos.

Métodos cuantitativos son aquellos procedimientos que permiten determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM).

Se define CIM como la mínima concentración de antibiótico que en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de un inóculo bacteriano previamente estandarizado (concentración conocida de gérmenes). Se define como CBM la mínima concentración de un antibiótico que en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inducir la muerte *in vitro* del 99.9% de una población bacteriana previamente

estandarizada. La determinación de la CIM puede realizarse por micro o macro dilución en caldo, dilución en agar o E-test (marca comercial).

Métodos cualitativos (disco difusión) son aquellos procedimientos que permiten clasificar directamente a un microorganismo como sensible o resistente. Este es uno de los métodos más utilizados en la práctica diaria y es el que los estudiantes podrán realizar durante el curso del CEFA.

Estandarización

Todos los métodos de estudio por nosotros utilizados, están estandarizados por el National Commitee for Clinical Laboratory Standars (NCCLS), de manera que los resultados sean reproducibles y comparables. La realización de estos procedimientos requiere la utilización de cepas de control de calidad con resultados conocidos, de manera de saber si nuestra metodología se realizó en forma correcta. Dentro de los parámetros a estandarizar se encuentran lo siguientes:

- a) El tipo de bacterias a estudiar, ya que no es lo mismo un microorganismo de crecimiento rápido que lento, exigente o no exigente, aerobio o anaerobio. Describiremos aquí los métodos para el estudio de microorganismos no exigentes, de crecimiento rápido, capaces de crecer en aerobiosis.
- b) Los medios de cultivo para realizar las pruebas. De los medios disponibles se considera que tanto el agar como el caldo Mueller Hinton (MH) son los más apropiados para las pruebas de sensibilidad de rutina dado que muestran buena reproducibilidad entre los diferentes lotes comerciales, son baratos, contienen bajo nivel de inhibidores de sulfonamidas, trimetoprim y tetraciclinas, son adecuados para la mayoría de las bacterias patógenas en lo que a requerimientos nutricionales se refiere y existen suficientes datos recopilados que avalan su uso en las pruebas de sensibilidad.

A pesar de estas cualidades, algunos parámetros del medio se deben controlar en cada lote de uso, como ser:

- pH: para cada lote debe ser controlado cuando se prepara el medio. El agar debe tener un pH 7,2-7,4 a temperatura ambiente. Si el pH es demasiado bajo ciertas drogas como aminoglucósidos, quinolonas y macrólidos parecerán menos activas, mientras otras como las tetraciclinas parecerán tener mayor actividad. Si el pH es más alto se podrán esperar los resultados opuestos.
- Humedad: si existe un exceso de humedad en la superficie del agar las placas deben ser incubadas a 35°C durante 10 a 30 minutos antes de utilizarse. Las placas deberán estar húmedas pero no mostrar gotas de agua en la superficie.
- Efecto de la timina o timidina: los medios que contienen un exceso de timina o timidina pueden revertir los efectos inhibitorios de las sulfonamidas y trimetoprim, produciendo alteraciones en las zonas de inhibición del crecimiento bacteriano en la placa.
- Cantidad de cationes divalentes: la variación de los cationes divalentes principalmente de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺, también afecta los resultados de antibióticos como tetraciclinas, aminoglucósidos, etc.

El medio debe ser preparado según las indicaciones del fabricante. Luego de preparado debe esterilizarse y cuando llega a una temperatura aproximada de 50° C debe ser repartido en las placas de Petri. El espesor del mismo debe oscilar entre 3 y 5 mm. Para esto se considera que aquellas placas de 150 mm de diámetro deben llevar 60 a 70 ml del medio, y las que

tienen 100 mm de diámetro deben llevar 25 a 30 ml. Las placas que no se usan en el día pueden mantenerse en el refrigerador; aquellas con más de siete días de preparación no son adecuadas, salvo que sean envueltas en bolsas de plástico para evitar la desecación, de lo contrario deben controlarse con los organismos de referencia. Debemos controlar la esterilidad de cada lote incubando al menos una de sus placas 24 hs o más a 35°C, verificando si hay o no crecimiento de algún microorganismo contaminante.

- c) El tiempo de incubación: la mayoría de los resultados deben leerse entre 18 y 20 horas, aunque para la lectura de la meticilinorresistencia en *S. aureus* debe incubarse 24 horas completas.
- d) La temperatura de incubación, lo cual altera la velocidad de crecimiento bacteriano y su viabilidad.
- e) El estado de los antibióticos, su fecha de vencimiento si se trata de discos, o su potencia si se trata de antibiótico como droga.

Si bien estos parámetros pueden ser controlados físicamente, es decir el operario puede controlar temperaturas, tiempos, estados de los medios, etc., los controles de calidad se realizan utilizando cepas conocidas. A continuación destacaremos algunos de los métodos antes mencionados.

Método de disco difusión

Este es un método cualitativo, que se caracteriza por ser fácilmente estandarizable y que está indicado para microorganismos no exigentes de crecimiento rápido. Partiendo de una muestra clínica siempre se debe realizar un cultivo puro para poder comenzar el estudio de la sensibilidad antibiótica. Para esto se utiliza la técnica de aislamiento en placas que contengan un medio adecuado para la cepa en estudio (al cual además se le deben otorgar las condiciones atmosféricas específicas de esa cepa). El antibiograma por disco difusión basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores, es uno de los métodos que el NCCLS recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos.

Indicaciones: el antibiograma está indicado en las siguientes situaciones:

- 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 más habituales.
- En estudios epidemiológicos, aunque hasta el momento no se halla descrito mecanismos de resistencia para dicho organismo.
- Cuando a pesar de conocerse la sensibilidad del germen a drogas altamente efectivas, el paciente no puede recibir dicha medicación (sensibilidad de *S. pyogenes* a eritromicina en pacientes alérgicos a la penicilina).
- En el estudio de nuevos antibióticos.

Fundamento: el método de disco difusión consiste en depositar en la superficie de una placa de agar MH previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel de filtro impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado en antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde por el agar, formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18 a 24 horas de incubación, los discos pueden o no aparecer rodeados por una zona de inhibición de crecimiento bacteriano.

Materiales: suero fisiológico estéril o caldo de cultivo estéril, hisopos estériles, pinzas estériles o dispensador, gradillas, descartador, ansa bacteriológica, estufa de 35°C.

Discos de antibióticos: los discos deben mantenerse en el freezer o en el refrigerador para mantener la actividad del antibiótico. Deben ser sacados una o dos horas antes de su uso. Debemos fijarnos siempre en la fecha de vencimiento antes de usarlos.

Patrón de turbidez: para estandarizar la densidad del inóculo se usa una suspensión de sulfato de bario como estándar de turbidez que corresponde a un 0,5 del nefelómetro de Mc Farland. La densidad se corrobora con un espectrofotómetro. Luego de preparado el patrón de turbidez se distribuye en tubos de ensayo (4 a 6 ml por cada tubo). Estos deben ser guardados a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Esta turbidez corresponde a 1.5×10^8 UFC/ml.

Medio: placas de agar MH.

Procedimiento (como preparar el inóculo): existen dos formas básicamente de como preparar el inóculo.

1. Método del medio de cultivo líquido o de Kirby-Bauer: con un asa bacteriológica se tocan cuatro o cinco colonias bien aisladas del mismo tipo morfológico y se inocula en 4 a 5 ml de caldo apropiado, como caldo MH. Los cultivos de caldo se dejan incubar a 35°C hasta que aparece una turbidez ligeramente visible (generalmente 2 a 5 hs). La turbidez se ajusta con suero fisiológico estéril o caldo para obtener una turbidez visualmente comparable a la de un estándar preparado previamente (llamado 0.5 de Mc Farland). Este estándar debe agitarse antes de usar y ser comparado en forma visual con el inóculo preparado. Para ello se miran ambos tubos al mismo tiempo contra un fondo blanco con una línea negra como contraste. Este método es recomendado cuando el cultivo tiene más de 24 hs de incubación.
2. Método de suspensión directa de colonias o Kirby-Bauer modificado: se colocan entre 4 y 5 ml de suero fisiológico estéril en un tubo de ensayo. Se toma con un asa bacteriológica tres o cuatro colonias morfológicamente similares y se suspenden en el tubo hasta alcanzar una turbidez comparable a la solución de Mc Farland 0.5. Luego de preparado el inóculo bacteriano con la cepa en estudio se deben seguir los siguientes pasos:
 - Introducir el hisopo estéril en el inóculo bacteriano preparado, de manera de embeberlo completamente. Antes de retirarlo se debe escurrir sobre las paredes del tubo para retirar el exceso de líquido del mismo.
 - Sembrar la placa de MH de manera de obtener un crecimiento confluyente, para lo cual se estría con el hisopo en forma paralela y bien compacta abarcando toda la superficie de la misma. Luego se repite el procedimiento rotando la placa 60° en dos oportunidades más. Deben extremarse los cuidados en sembrar las placas de borde a borde, porque de lo contrario pueden haber problemas en la realización de las lecturas.
 - Dejar secar 3 a 5 minutos antes de colocar los discos.
 - Colocar los discos. Estos deben ser colocados con dispensador o pinza estéril. Luego de estar sobre el agar se debe presionar los discos levemente para que queden adheridos al mismo. Deben estar a más de 15 mm del borde de la placa y deben distribuirse de manera de que no haya superposición de los halos de inhibición. En las placas de 150 mm no se colocarán más de 12 discos, y en las placas de 100 mm no es aconsejable colocar más de 6.
 - Luego de colocados los discos las placas deben incubarse a 35°C a 37°C en grupos no mayores a cinco placas durante 18 hs. Para detectar la meticilinorresistencia las placas deben incubarse 24 hs completas. Las placas deben colocarse en forma invertida para que el agua condensada no caiga sobre el agar, lo que cambiaría las condiciones del medio y por lo tanto no serviría para la lectura de los halos.

Ventajas: es un método sencillo, barato y de fácil control y estandarización. Una ventaja adicional del método y específicamente del medio, es que se le pueden realizar algunas modificaciones en cuanto a los requerimientos nutricionales para poder llevar a cabo el antibiograma con microorganismos exigentes o muy exigentes que necesitan más nutrientes que los que este medio les puede ofrecer. Un ejemplo claro es *S. pneumoniae*, microorganismo exigente para el cual se puede hacer un agregado de sangre de oveja desfibrinada en una concentración al 5%. Muchas veces estos agregados generan cambios conocidos en los halos de inhibición del crecimiento bacteriano.

Control de calidad

Para proceder a la lectura de los antibiogramas debemos previamente asegurarnos que se cumpla un estricto control de calidad para supervisar la exactitud y fiabilidad de la metodología. Esto se realiza debido a que existe un gran número de variables que pueden afectar los resultados dentro de las que se destacan:

- a) actividad de los discos (cuidar que no estén vencidos o que pierdan su carga por almacenamiento incorrecto);
- b) inadecuada composición y espesor del medio;
- c) alteraciones en más o en menos en el inóculo (patrón de turbidez 0.5 de la escala de Mc Farland);
- d) problemas con el tiempo o temperatura de incubación, etc.

Para llevar a cabo eficientemente este control de calidad al mismo tiempo que se realiza el procedimiento para la cepa en estudio, se realiza para una cepa control. Las cepas control utilizadas serán las recomendadas por la NCCLS. Estas cepas son denominadas ATCC, una marca registrada (American Type Culture Collection). Estas son cepas conocidas, de las cuales se sabe su patrón de resistencia o sensibilidad. Se conocen y se han establecido los rangos de diámetros en el que debe estar la zona de inhibición de crecimiento bacteriano si las condiciones del procedimiento son las adecuadas. Estos datos se encuentran en tablas de la NCCLS. Se debe verificar que los diámetros de inhibición del crecimiento bacteriano de los discos de antibióticos entren dentro de los establecidos en las tablas, de lo contrario podremos concluir que existe alguna variable que está cambiando las condiciones en que debe ser realizado el procedimiento.

MEDICIÓN DE LOS HALOS E INTERPRETACIÓN DE LOS MISMOS

Luego de corroborar que las cepas ATCC se encuentran en rango procedemos a realizar la lectura de los antibiogramas. La lectura se realiza a través de la medición de los halos de inhibición. Al igual que para las ATCC, existen tablas proporcionadas por la NCCLS que según el diámetro del halo de inhibición de crecimiento bacteriano, definen categorías de resistencia, sensibilidad y sensibilidad intermedia.

MÉTODO DE GRADIENTE ANTIBIÓTICO (E-TEST)

Este es un método cuantitativo. El principio de este método es una expansión de la técnica de difusión en disco. En el método E-test podemos, mediante lectura directa, determinar la CIM. Consiste en una tira de plástico no poroso de 6 cm de largo por 5 mm de ancho que incorpora un gradiente predefinido de antimicrobiano equivalente a 15 diluciones. El protocolo para preparar el inóculo es el mismo que para la difusión en disco. Siguiendo el método de difusión, una vez inoculado la placa de agar con el microorganismo, se coloca la tira de E-test sobre su

superficie, produciéndose de forma inmediata una difusión del antibiótico desde el soporte hasta el agar, creándose de este modo a lo largo de la tira un gradiente exponencial de las concentraciones del antimicrobiano. Tras la incubación de las placas, se puede observar una zona de inhibición elipsoidal y simétrica. Después de la incubación la CIM será el valor donde la elipse corta la tira. Las tiras deben conservarse a menos de 20°C y deben estar protegidas de la humedad. Antes de usarse se deben atemperar a temperatura ambiente durante por lo menos 30 minutos. Las placas de Petri con el medio de MH y la forma de sembrado es la misma que en el método de disco difusión. Luego se colocan las tiras sobre la superficie del agar. Se debe dejar absorber el inóculo de 10 a 15 min para asegurar que la superficie del agar esté completamente seca antes de aplicar las tiras. Debemos asegurarnos que la tira contacte completamente con la superficie del agar. No se deben mover las tiras una vez que han sido colocadas, ya que el antibiótico empieza a difundir rápidamente. Cuando se usa una placa de Petri de 100 mm depositar solo una tira por placa y poner la tira en el centro de la placa, si se usa una de 150 mm no se deben colocar más de 6 tiras. Se incuba durante 16 a 20 hs a 37°C o según los requerimientos óptimos de la cepa bacteriana en estudio. Si colocamos la tira al revés no se observa elipse de inhibición, ya que el gradiente de concentraciones se sitúa solo sobre una de las caras de la tira. Se considera como un método alternativo para el estudio cuantitativo de la sensibilidad antimicrobiana del que cabe destacar su sencillez y buena correlación con la técnica estándar de dilución en agar para el estudio de la CIM, que se detalla más adelante.

Métodos de dilución

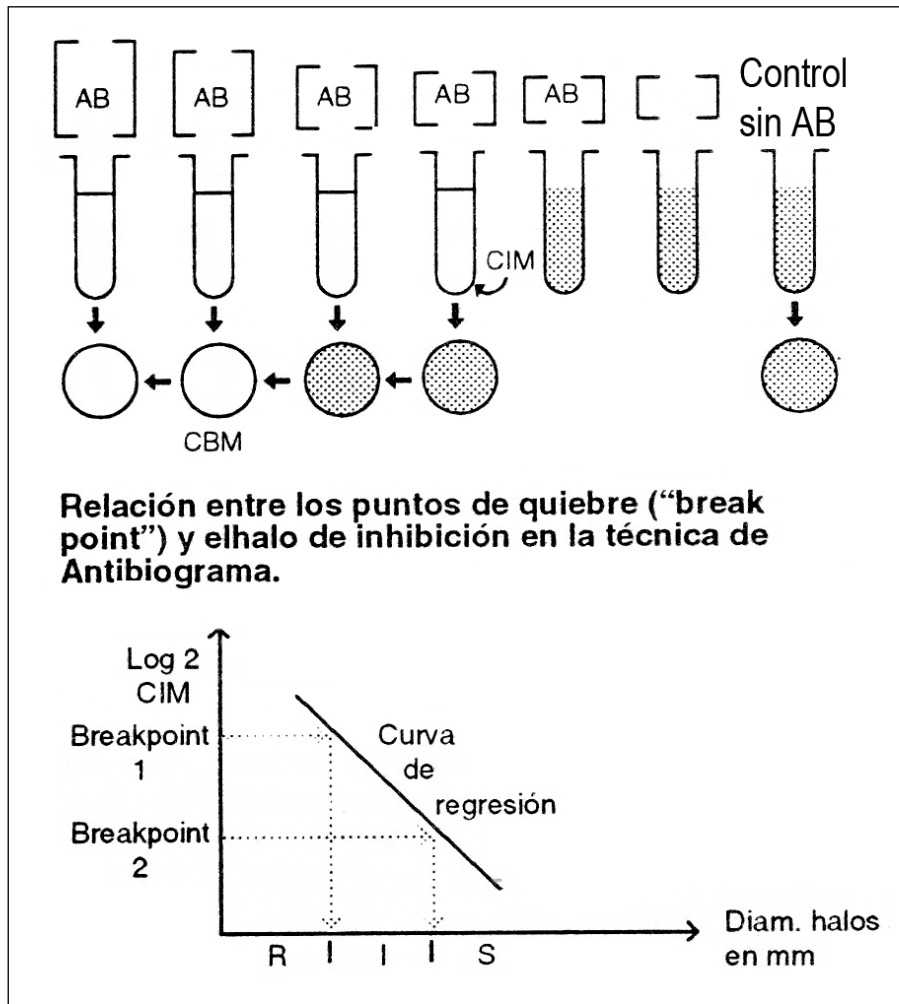
Las primeras determinaciones se realizaron empleando una cantidad considerable de tubos con caldo de cultivo, a los cuales se le colocaban diluciones crecientes de antibióticos con el mismo fundamento que el descrito para el método de dilución en agar. Este procedimiento se denominó macrodilución en caldo. Esta metodología es muy engorrosa, por la cantidad de material y de manipulaciones necesarias para su realización. La aparición de un sistema de inoculación múltiple para placas de agar popularizó el método de dilución en agar, en el que cada placa, con una cierta concentración de antimicrobiano, permite inocular simultáneamente un gran número de microorganismos. La utilización de micropipetas y de placas de microtitulación facilitó la utilización del método de microdilución en caldo; en la actualidad se han popularizado los métodos automatizados comerciales de microdilución en caldo, fácilmente integrables en sistemas semiautomáticos de lectura e interpretación de resultados, pero con el grave inconveniente del incremento de su costo. Dentro de estos describiremos la macrodilución en caldo.

MACRODILUCIÓN EN CALDO

Las pruebas de dilución han sido utilizadas durante años. Los procedimientos iniciales eran realizados en tubos de ensayo grandes (13 por 100 mm) con volúmenes de caldo de por lo menos 1 ml. Este método fue estandarizado en la década de los años 70 por el Estudio Cooperativo Internacional y luego la NCCLS publicó un estándar del método. Este método es llamado macrodilución en caldo. A partir de los años 60 se comenzaron a utilizar dispositivos serológicos para dispensar y diluir. Esta miniaturización simple de la técnica se conoció como microdilución en caldo.

Fundamentos: consiste en exponer a las cepas a estudiar a diferentes concentraciones de

Figura 1. Determinación de la Concentración inhibitoria mínima (CIM) y de la Concentración Bactericida Mínima (CBM)



antimicrobianos, en diluciones a la mitad y observar el crecimiento de los microorganismos para luego definir la CIM (ver figura 1).

Materiales y métodos: en el método de macrodilución se emplea por cada combinación de microorganismo con antimicrobiano, un juego de tubos. Habitualmente se prepara el juego de tubos con 1ml de caldo MH suplementado con Ca^{++} y Mg^{++} estéril sin antimicrobiano. Para un pequeño número de pruebas se preparan diluciones al doble directamente en los tubos, del modo siguiente. Se colocan 2 ml de solución de antibiótico en el primer tubo de la serie de diluciones. En cada uno de los tubos restantes se añade 1 ml de caldo MH. Con una pipeta estéril se transfiere 1 ml del primer tubo al segundo. Después de mezclar el contenido del segundo tubo, se transfiere 1 ml con una pipeta diferente (en esta transferencia y en todas las sucesivas) al tercer tubo. El proceso continúa hasta el penúltimo tubo, al que se le quita 1 ml, que se descarta. El último tubo no recibe solución de antibiótico y sirve de control de crecimiento. Las concentraciones finales de antibióticos en esta prueba son iguales a la mitad

de la serie inicial de dilución, debido al agregado de una concentración igual de inóculo en el caldo. Se prepara un inóculo bacteriano que contenga 10^5 a 10^6 UFC/ml ajustando la turbidez de un caldo de cultivo al estándar y diluyendo luego a 1:200 en caldo. Añadir a cada tubo 1 ml del inóculo ajustado. Incubar los tubos a 35°C entre 16 y 20 horas.

LECTURA E INTERPRETACIÓN DE LA CIM

La CIM corresponde a la mínima concentración de antibiótico en donde no se observa desarrollo (turbidez). La CIM se expresa en $\mu\text{g/ml}$. Luego se debe recurrir, teniendo en cuenta el valor de CIM obtenido para esa cepa, a las tablas para definir según los valores de CIM que en ellas aparecen si las cepas en estudio son sensibles o resistentes a un determinado antibiótico.

Interpretación de los estudios de sensibilidad antibiótica

Los resultados de sensibilidad serán interpretados de acuerdo a las tablas de la NCCLS. Se definen tres categorías: resistente, intermedio y sensible. El resultado sensible significa que hay una alta probabilidad de que el paciente responda al tratamiento con el antibiótico testado. El resultado resistente implica alta chance de falla terapéutica. La categoría intermedia puede tener varios significados. Con agentes que se puede administrar a altas dosis, puede significar que se deben utilizar altas dosis para que el tratamiento sea eficaz o que el agente puede ser eficaz si se concentra en el sitio de infección. También puede representar una zona buffer que impide que cepas con sensibilidad borderline sean categorizadas como resistentes. Los breakpoints o puntos de quiebre son los valores de concentración que permiten la categorización en sensible, resistente o intermedio. Para establecer el valor de estos breakpoints se utilizan cuatro fuentes:

1. La observación de la distribución de CIM que indica como se comportan la mayoría de las cepas y si hay distribuciones anormales que pueden marcar la presencia de un mecanismo de resistencia.
2. Los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos que ya mencionamos en el capítulo de antibióticos.
3. La respuesta clínica y bacteriológica a la utilización del antibiótico en cuestión. Se espera una tasa de respuesta favorable del 80% para que el organismo sea clasificado como sensible.
4. Una vez se establecen los breakpoints para CIM se deben elegir los breakpoints para la disco difusión. Esto se obtiene mediante una regresión lineal (ver figura 1).

Bibliografía

- Ferraro, M. J. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eleventh Informational Supplement. Vol 21, Nº 1 M100-S11 NCCLS.
- Ferraro, M.J. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Performance Standards for Antimicrobial Disks Susceptibility Tests. Approved Standard-Seventh Edition. Vol 20, Nº 1 M2-A7 NCCLS.
- Ferraro, M.J. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Fifth Edition. Vol 20, Nº 2, M7-A5 NCCLS.

- Cantón R, García JE, Gómez L, Martínez L, Rodríguez C, Vila, J, García J.A Procedimientos en Microbiología Clínica. Métodos Básicos Para el Estudio de la Sensibilidad a los Antimicrobianos en Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Editor Picazo J J. 2000 <http://www.seimc.org>

