

# Determinación de la sensibilidad de un microorganismo a agentes con bioactividad por los métodos de difusión en agar, CIM y CBM

DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE UN MICROORGANISMO A AGENTES CON BIOACTIVIDAD POR LOS MÉTODOS DE DIFUSIÓN EN AGAR, CIM Y CBM	2
MÉTODOS DIFUSIÓN EN AGAR	5
PRUEBAS POR DILUCIÓN EN CALDO	11

## Objetivos:

Aprender dentro del manejo del laboratorio:

Determinación de difusión en agar

Determinación de la concentración inhibitoria mínima (C.I.M.).

Determinación de la concentración bactericida mínima (C.B.M.).

Interpretar los resultados entregados por la distintas técnicas

## Determinación de la sensibilidad de un microorganismo a agentes con bioactividad por los métodos de difusión en agar, CIM y CBM

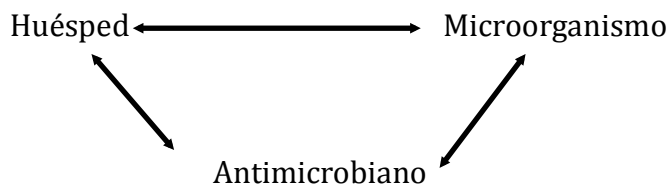
El estudio de la sensibilidad de los microorganismos a compuestos bioactivos es una de las funciones del laboratorio de microbiología. Pero la determinación de la sensibilidad no implica solo realizar un conjunto de técnicas y medir resultados, se debe interpretar y darles el significado que posee.

Los métodos pueden clasificarse en métodos cuantitativos (CIM y CBM) y métodos cualitativos. El CIM, concentración inhibitoria mínima, que se define como la menor concentración del compuesto con bioactividad capaz de inhibir in vitro el desarrollo del microorganismo testado. La CBM, concentración bactericida mínima, es la menor concentración del compuesto con bioactividad capaz de inducir la muerte in vitro del 99.9% el microorganismo testado. Y los métodos cualitativos, discos difusión, son aquellos que permiten clasificar a los microorganismos como sensibles o resistentes. Ambos tipos de métodos están estandarizados de manera que los resultados sean reproducibles y comparables.

Los compuestos con bioactividad producidos por los microorganismos son los antibióticos, estos se emplean para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Es por ello importante que la sustancia posea una toxicidad selectiva. La toxicidad selectiva se basa en las diferencias de las estructuras celulares de mamíferos y agentes infecciosos.

Para que una sustancia sea útil en el tratamiento sistémico de una enfermedad infecciosa debe actuar contra el agente infeccioso y ser total o relativamente inocua para el huésped. Este criterio nos diferencia a los antibióticos de los antisépticos y desinfectantes (estos últimos dos son perjudiciales para los microorganismos pero también para los mamíferos por vía oral o parenteral).

La quimioterapia es una rama de la farmacología que estudia la influencia de los compuestos químicos sobre los diferentes agentes patógenos que afectan a mamíferos. Existe una interrelación entre los tres participantes del sistema:



(1) La interacción Huésped-antimicrobiano debe ser tal que no existan, a dosis terapéuticas, reacciones indeseables.

(2) La relación Huésped-microorganismo depende de dos parámetros: uno depende de las defensas del huésped, y el otro de la virulencia del agente patógeno.

(3) La acción del antimicrobiano sobre el microorganismo y la contrapuesta se miden in vitro (prueba de sensibilidad a los antibióticos, concentración inhibitoria mínima, concentración bactericida mínima). Con estas determinaciones medimos la utilidad de un determinado antibiótico con la cepa causante de la enfermedad.

El índice quimioterápico se basa en las diferencias que puede presentar la toxicidad selectiva. El índice es el cociente entre DL 50 (dosis que provoca la muerte al 50% de los animales tratados) y DC 50 (dosis que cura al 50% de los animales enfermos tratados).

---

La efectividad de un antimicrobiano está dada por una baja DC 50 (que se deba administrar en muy baja cantidad) y una muy alta DL 50 (que se necesiten grandes cantidades para producir toxicidad).

### **Fleming formuló reglas para los antibióticos:**

- 1- Un antibiótico sólo debe aplicarse a bacterias sensibles.
- 2- Debe administrarse en cantidad suficiente y por la vía apropiada para lograr concentraciones efectivas.
- 3- Debe tener una difusión tal que le permita llegar al lugar de la infección.
- 4- Debe administrarse hasta la total eliminación del proceso séptico.

Condiciones que debe reunir un antibiótico ideal:

1.- Su acción debe ser:

- Selectiva, potente y de amplio espectro.
- Básicamente bactericida.
- Independiente de la presencia de líquidos biológicos (sangre, exudados, etc.).
- Libre de toxicidad y sensibilización alérgica.
- Insensible frente a los mecanismos de resistencia bacteriana.

2.- Poseer:

- Un índice quimioterápico que permita dosis máximas durante períodos prolongados.
- Una absorción, distribución y excreción que permitan un rápido nivel tisular y lo mantengan durante un tiempo suficiente.
- Debe sintetizarse en cantidades suficientes y a un precio razonable.

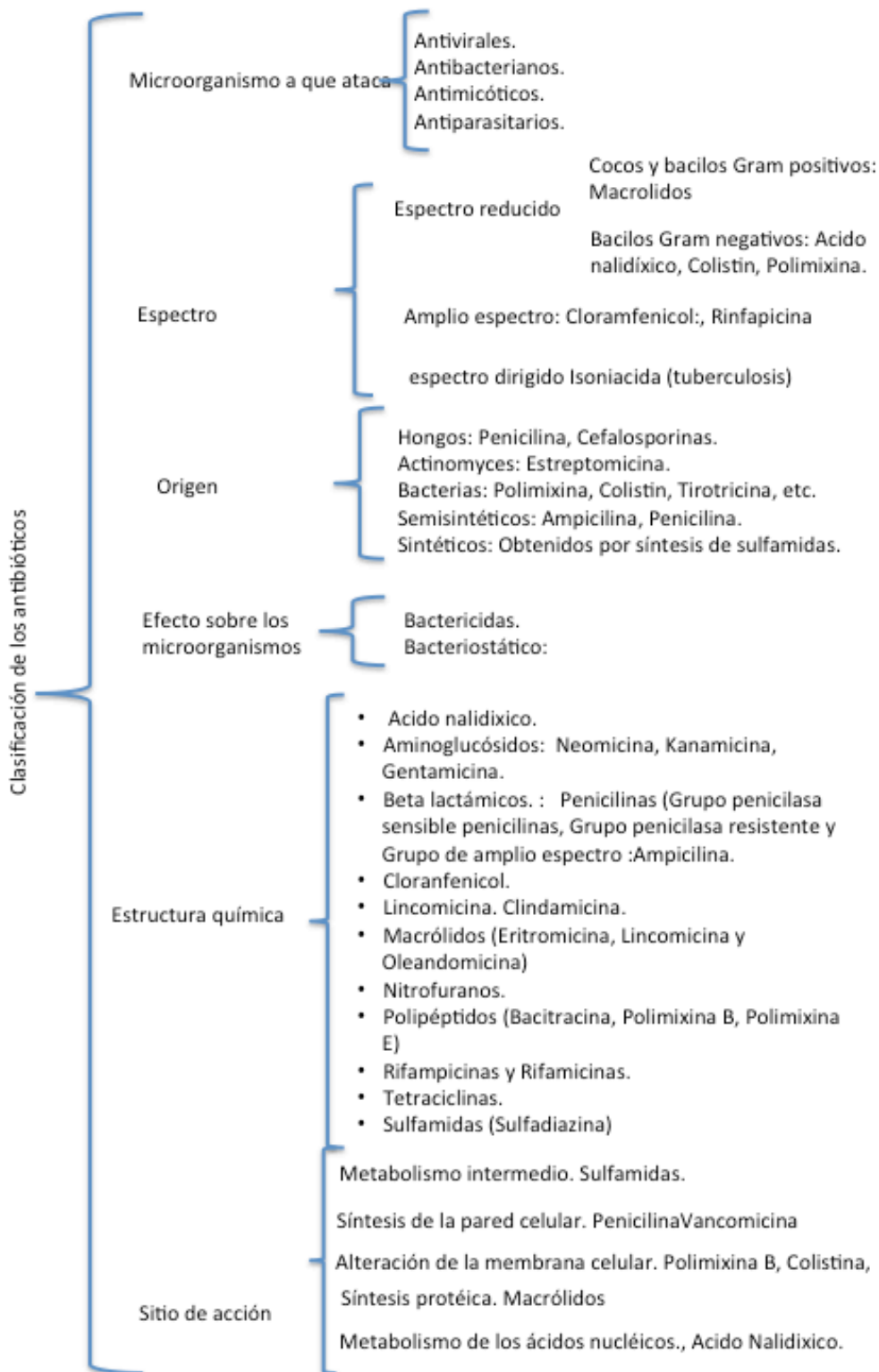


Tabla 1. Clasificación de los antibióticos

## Métodos difusión en agar

La difusión en agar (antibiograma) es una prueba que enfrenta el microorganismo inoculado en la superficie del agar con un hisopeo en tres direcciones (ver más abajo el esquema) con una solución del compuesto con bioactividad (en el práctico antibiótico) absorbido en discos de papel de filtro. Es un método estandarizado por *National Committee for Clinical Laboratory Standard* (NCCLS) y *Food and drugs administration* (FDA) Varios factores afectan el halo de inhibición, ellos son: el agar utilizado composición, pH, altura del agar, el inoculó, la carga de los discos, tiempo de desarrollo.

Es un método flexible en cuanto a los antimicrobianos que pueden probarse (basta contener el disco con el antibiótico a ensayar). Se pueden efectuar pruebas individuales en cualquier momento. Es técnicamente simple pero requiere gran cuidado en la ejecución de la técnica. Sólo es aplicable a microorganismos que desarrollan en 18-24 horas y a microorganismos aerobios.

Aunque no se aconseja, puede realizarse antibiograma en forma directa de muestras clínicas cuando exista urgencia (por ej: meningitis) y cuando el frotis de Gram indique un número, moderado a grande de un sólo tipo de microorganismo. Los resultados siempre deben ser comprobados por el método standard.

Los antibióticos que difunden mal en el agar (Polimixina, Colistin) presentan dificultad en las cepas sensibles.

Con éste método se obtienen datos con un grado aceptable de exactitud, que permiten resolver la gran mayoría de los casos clínicos que se presentan en el laboratorio.

La técnica esta estandarizada para:

**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, trimetoprima y tetraciclinas, no posee glucosa, lo que evita la inhibición de ciertos antibioticos por acides producida por la fermentación, 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.

Por las variaciones que se pueden presentar entre los lotes de medio de cultivo ante una nueva partida de medio se debe controlar:

- 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.

Placa de Petri , altura del medio de cultivo debe ser de 4mm, para ello las placas de 150 mm de diámetro deben llevar 60 ml del medio, y para tienen 100 mm de diámetro deben llevar 25 ml.

#### **Los discos con el compuesto biactivo:**

Los cambios de concentración (o contenido de los discos) influyen en el diámetro de inhibición. Las potencias de los discos deben dar zonas de inhibición superiores a 10 mm para las cepas sensibles pero es inconveniente que superen los 40 mm.

Los discos deben conservarse en heladera o congelarse en seco.

Los discos con Penicilina y Cefalosporinas deben guardarse en congelador porque se inactivan con mucha facilidad.

Antes de abrir la caja que los contiene hay que dejar que tomen temperatura ambiente, para evitar condensación del agua.

Nunca deben usarse discos vencidos.

## **Inoculó**

Debe realizarse la estandarización del inóculo debido a que el tamaño del halo de inhibición varía en forma inversa al tamaño del inóculo (inóculos más densos producen zonas o halos más pequeños e inóculos poco densos dan halos mayores). La variación puede ser lo suficientemente grandes como para cambiar la clasificación de sensibilidad del microorganismo.

La preparación del inóculo es conveniente hacerla en caldo Müeller Hinton u otro que contenga peptonas de hidrolizado de caseína.

El inóculo se prepara a partir de varias colonias morfológicamente iguales, con el objeto de obtener una suspensión representativa de células que pueden estar infectadas por plásmidos o fagos que inducen a resistencia a los antibióticos, o tomar una colonia que provenga de una célula mutante que halla eliminado o "curado" alguna resistencia.

La suspensión de microorganismos debe tener una turbidez comparable a la turbidez del tubo **0.5 de la escala de Mc Farland** que representa un valor de  $1.5 \times 10^8$  mo/ml.

#### **Fundamento del método:**

Los antimicrobianos se aplican en discos de papel de filtro que son embebidos en una solución del antibiótico.

Cuando se aplica el disco seco sobre el agar, se suceden los siguientes hechos:

El disco absorbe agua y disuelve el antibiótico.

El antibiótico disuelto migra, a través del agar, siguiendo las leyes físicas de la difusión en geles.

El resultado final es la formación de un gradiente de concentración desde el disco a la periferia.

Al progresar la difusión del antibiótico en el agar, se produce también la multiplicación bacteriana. (Recordar curva de crecimiento).

No se presenta desarrollo en la zona donde se iguala o supera la CIM (concentración inhibitoria mínima). Cuanto más susceptible son los microorganismos más grande es la zona de inhibición.

El diámetro de la zona de inhibición es inversamente proporcional a la CIM y está determinado por:

- Fase de demora (dos o tres generaciones).
- Tiempo de generación del microorganismo de ensayo. Hay que tener en cuenta que los microorganismos de desarrollo más lento dan halos más grandes.
- Velocidad de difusión del antibiótico en el gel de agar.

Por lo tanto no pueden compararse zonas de inhibición de diferentes drogas.

Interpretación de la zona de inhibición:

Se deben fijar los diámetros mínimos para considerar sensibles a los microorganismos para cada antibiótico usado y para cada carga (o potencia) de disco.

Los standards para la interpretación de los diámetros de los halos son diferentes para cada agente, debido a la variación en la concentración de los discos, y a la diferencia en las propiedades de solubilidad y difusión de cada droga en el medio de Müeller Hinton. Las zonas o halos diseñados en formas plásticas fueron desarrollados comparando el tamaño de los halos en un gran número de pruebas, empleando una serie de diluciones en tubo y placa, y relacionándolas con los niveles que se alcanzan en la sangre y las dosis frecuentemente empleadas. En el caso de la Nitrofurantoina y el ácido Nalidixico, los niveles de orina fueron tomados en cuenta en los standards establecidos. La confirmación de la validez de estos standards ha sido obtenida, asimismo, de las curvas que muestran la distribución de las sensibilidades de un gran número de cepas individuales de varias especies en relación con la experiencia clínica y el tratamiento de las infecciones causadas por las mismas. Todos estos factores fueron tomados en cuenta en el establecimiento de los límites de los halos. (Ver tabla de interpretación según Kirby Bauer).

Técnica:

- Se seleccionan 4 o 5 colonias del mismo tipo morfológico.
- Se prepara una suspensión en solución fisiológica estéril, ajustando la turbidez al tubo 0,5 de Mc Farland (0,5 ml de Cl<sub>2</sub>Ba 1,175% peso/volumen a 99,5 ml de ácido sulfúrico 0,36 N 1%).
- La suspensión del inóculo no debe dejarse reposar más de 10 a 20 minutos. -  
Para inocular el agar, se sumerge un hisopo de algodón (estéril) en la suspensión estandarizada, eliminando el exceso de líquido presionando sobre las paredes del tubo.
- El hisopo así preparado se pasa sobre el agar Müeller Hinton de 4 mm de

profundidad en tres direcciones, teniendo cuidado de no presionar demasiado.

- Se deja secar la placa inoculada en estufa durante 15 minutos, antes de aplicar los discos.
- Después de 15 minutos de inoculada la placa se colocan los discos ejerciendo una suave presión para que tomen íntimo contacto con el agar.

Los discos no deben aplicarse a menos de 15 mm de los bordes.

La placa se incuba en estufa a 35/37°C, durante 24 hs en atmósfera normal.

Cumplido este tiempo el medio debe presentar crecimiento difuso, casi confluyente, pero deben verse colonias aisladas. Si sólo se desarrollan colonias aisladas en la placa de prueba, el inóculo era poco denso y la prueba debe ser repetida. Se debe evitar la incubación en presencia de CO<sub>2</sub> ya que modifica el pH del medio y esto puede afectar la actividad de algunos antibióticos

Debe evitarse la incubación con CO<sub>2</sub>, pues este altera el pH superficial del medio suficiente como para alterar la actividad antimicrobiana de algunos agentes.

Los tiempos deben respetarse al máximo, pues un alargue en los tiempos de difusión dará como sensibles cepas que no lo son.

- **Lectura de los resultados:**

Se mide cada halo empleando una regla por la cara inferior de la placa de Petri. A continuación se compara dicha lectura con la tabla de las zonas o halos de inhibición según Kirby Bauer y modificaciones posteriores.

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.



Tabla de interpretación de zonas o halos inhibición según KIRBY BAUER

Antibiótico o Agente Quimioterápico	Potencia del disco	Diámetro de la zona o halo de inhibición en mm.		
		Resistente	Intermedio	Sensible
A AM1 Staphylococcus	10 ugm	20 0 -	21-28	29 0 +
M y org. altamente				
P sensibles a Penic.				
I				
C				
I AM2 Gram (-) y	10 ugm	11 0 -	12-13	14 0 +
L Enterococos				
I				
N				
A AM3 Haemophyllus*		20 0 +		
Bacitracina	10 U	8 0 -	9 - 12	13 0 +
Carbenicilina CB1		6 0 -	12 - 14	15 0 +
Carbenicilina CB2		16 0 -	19 - 21	22 0 +
Cefaloridina	30 ugm	11 0 -	12 - 15	16 0 +
Cefalotina	30 ugm	14 0 -	15 - 17	18 0 +
Cloranfenicol	30 ugm	12 0 -	13 - 17	18 0 +
Cefaloglicina**	30 ugm	11 0 -	15 0 +	
Colistin	10 ugm	8 0 -	9 - 10	11 0 +
Eritromicina	15 ugm	13 0 -	14 - 17	18 0 +
Gentamicina*	10 ugm		13 0 +	
Kanamicina	30 ugm	13 0 -	14 - 17	18 0 +
Lincomicina	2 ugm	9 0 -	10 - 14	15 0 +
Metionina	5 ugm	9 0 -	10 - 13	14 0 +
Nafcilina y Oxacilina*	1 ugm	10 0 -	11 - 12	13 0 +
Ácido nalidíxico**	30 ugm	13 0 -	14 - 18	19 0 +
Neomicina	30 ugm	12 0 -	13 - 16	17 0 +
Novobiocina***	30 ugm	17 0 -	18 - 21	22 0 +
Nitrofurantoina**	300 ugm	14 0 -	15 - 16	17 0 +
Oleandromicina	15 ugm	11 0 -	12 - 16	17 0 +
Staphylococcus P1	10 U	20 0 -	21 - 28	29 0 +
Penicilina G				
Otros org. P2	10 U	11 0 -	18 - 21	22 0 +
Polimixina B	300 U	8 0 -	9 - 11	12 0 +
Estreptomicina	10 ugm	11 0 -	12 - 14	15 0 +
Sufamidas****	300 ugm	12 0 -	13 - 16	17 0 +
Tetraciclina	30 ugm	14 0 -	15 - 18	19 0 +
Vancomicina	30 ugm	9 0 -	10 - 11	12 0 +

\* Standards tentativos.

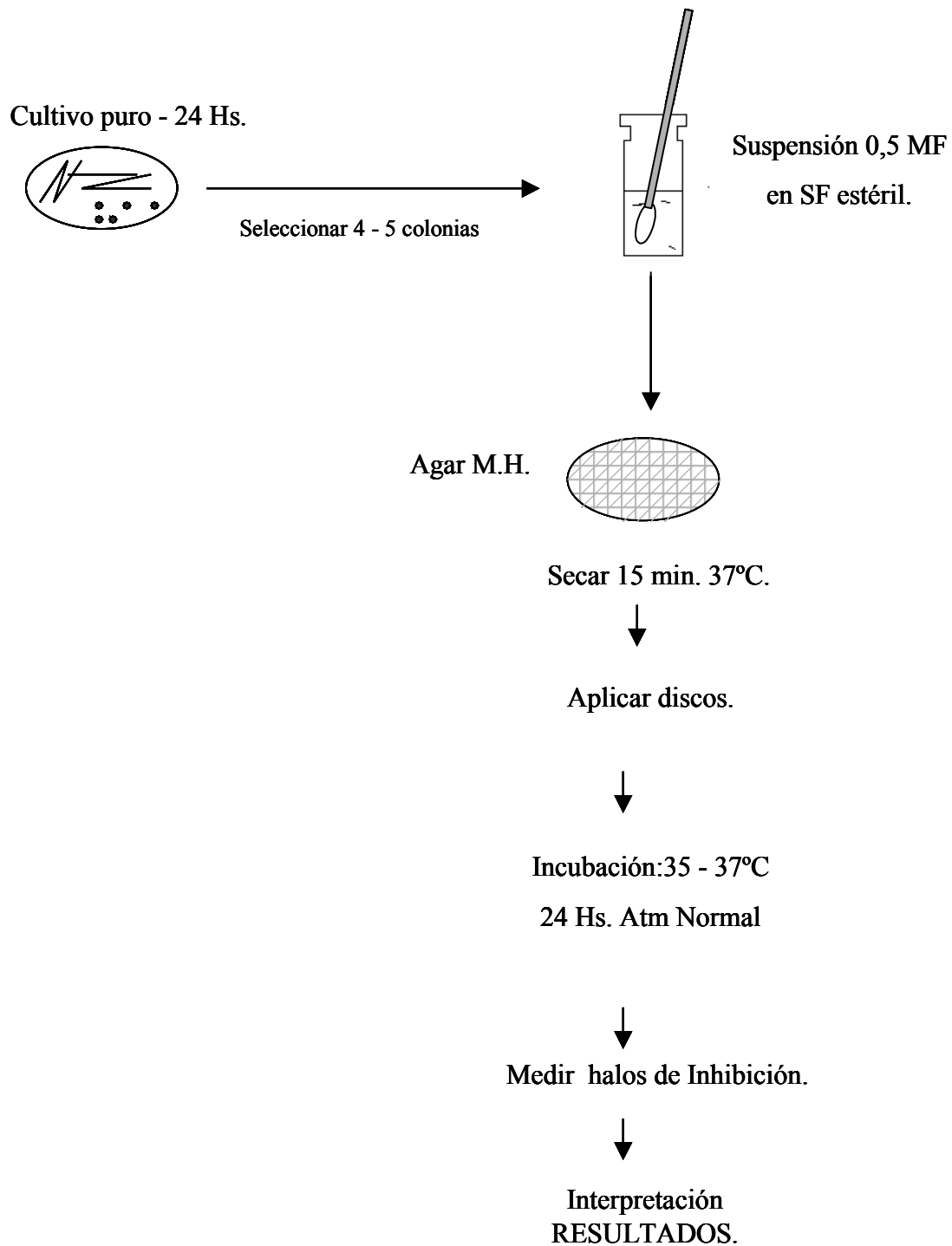
\*\* Infecciones de las vías urinarias solamente.

\*\*\* No son aplicables a medios conteniendo sangre.

\*\*\*\* Cualquiera de los discos de sulfas de 300 o 250 ugm puede ser utilizado con el mismo standard de interpretación de la zona.

# Esta categoría incluye microorganismos, tales como los Enterococos, los cuales pueden causar infecciones sistémicas curables con altas dosis de Penicilina G.

## Pruebas de Antibiograma - Difusión en Agar



## Pruebas por dilución en caldo

Es un método cuantitativo mediante el cual puede determinarse la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de un antimicrobiano.

No están influenciadas por la velocidad de crecimiento de los microorganismos en estudio, por lo tanto puede utilizarse tanto para microorganismos de rápido como de lento desarrollo. Se utiliza para bacterias aerobias y anaerobias pero no puede inocularse material clínico (por las contaminaciones).

Por lo tanto están expresamente indicadas para:

Cuando se necesitan datos cuantitativos.

Cuando los resultados por difusión son inaplicables (microorganismos de desarrollo lento).

Cuando hay una sensibilidad intermedia con la prueba de difusión y son antibióticos tóxicos, pero los únicos que clínicamente son aplicables.

En microorganismos anaeróbicos.

Puede aplicarse como micrométodo (MICRODILUCION) o macrométodo (MACRODILUCION).

Fundamento del método:

En los métodos de dilución en caldo se colocan concentraciones decrecientes del agente antimicrobiano en tubos con un caldo nutritivo que sostendrá el desarrollo del microorganismo. Aquellos tubos en los que la concentración de antimicrobiano no es efectiva aparecerán turbios dado por el crecimiento bacteriano.

Consideraciones a tener en cuenta:

El caldo más comúnmente usado para estas pruebas es el de Müeller Hinton por las mismas razones que el agar (ver Método de Difusión en Agar).

Los agentes antimicrobianos se preparan en soluciones concentradas en un diluyente apropiado y luego se diluyen hasta obtener las concentraciones apropiadas (generalmente diluciones al medio).

El inóculo estándar del microorganismo es, con mayor frecuencia de  $1 \times 10^6$  mo/ml (dilución 1:500 de una suspensión bacteriana igual al tubo N°1 de Mc Farland).

### Técnica - macrodilución en caldo:

Se seleccionan 4 ó 5 colonias del mismo tipo morfológico.

Se prepara una suspensión de microorganismos en el caldo MH, con turbidez que represente  $1 \times 10^6$  mo/ml.

Se preparan las diluciones a probar del antimicrobiano y se coloca 1ml de cada una de ellas en tubos estériles perfectamente rotulados con la concentración probada correspondiente.

A cada tubo anterior con antimicrobiano se le agrega 1 ml de la suspensión bacteriana (tener en cuenta que la concentración del antimicrobiano se diluye a la mitad).

Se utilizan dos tubos control:

- 1) Caldo sin inocular como control negativo en la lectura de los resultados. También es útil para controlar posible contaminación.
- 2) Caldo inoculado pero sin antimicrobiano como control positivo de desarrollo y de utilidad en el cálculo de la CBM. De este tubo se realiza un recuento bacteriano en una placa de agar nutritivo.

- Los tubos son incubados adecuadamente.

### **\* Cálculo de la CIM:**

Se observa la turbidez de los tubos por comparación con el Control Negativo. El microorganismo crecerá en el Control Positivo y en todos los tubos que no contengan suficiente agente antimicrobiano como para inhibir el desarrollo, con estos resultados se calcula de CIM.

**CIM:** está dada por la menor concentración del agente que presenta falta de turbidez.

A cada tubo que no presentó turbidez se le realiza un recuento en placa para hallar la CBM.

### **\* Cálculo de la CBM:**

Se compara los valores de los recuentos obtenidos de los tubos negativos con el del tubo considerado control positivo (éste nos da la cantidad de bacterias inoculadas y representa el 100%). De esta forma se calcula qué porcentaje de crecimiento se obtuvo de cada tubo sin turbidez.

**CBM:** está dada por la menor concentración del antimicrobiano que permite el crecimiento del 0,1% de los microorganismos inoculados originalmente.

## **Influencia de la variación de técnicas sobre los resultados de las pruebas de susceptibilidad:**

Están bajo la influencia de:

Reactivos.

Condiciones de la prueba:

- Densidad del inóculo.
- Temperatura de incubación.
- Tiempo.
- pH.
- Atmósfera.

- Estabilidad de los agentes antimicrobianos.

En las pruebas de difusión tienen también importancia:

- Velocidad de crecimiento (desarrollo) del microorganismo.
- Del agar usado:
  - Tipo.
  - Profundidad.
  - Concentración.
  - Fuerza iónica.

Fuentes de error:

1.- Del medio de cultivo:

- Uso de un medio no apropiado (Müeller Hinton, DST, etc.).
- Mala preparación del medio:
  - Mal pesado.
  - Mal ajuste del pH.
  - No agitarlo al prepararlo.
- Uso de medio de cultivo vencido, seco o demasiado húmedo.

2.- De los discos:

- De mala calidad o mal cargados (con exceso o defecto).
- Demasiados discos en una caja.

3.- Del inóculo:

- Mala standarización de la densidad del inóculo (o comparación con estándares no apropiados, vencidos, etc.).
- Excesiva demora desde la standarización hasta la inoculación.
- Inóculo demasiado abundante.

4.- Otros:

- Demora excesiva en el secado de las placas después de sembradas.
- Demora excesiva en incubar las placas después de aplicados los discos.
- Inocular cultivos mixtos.
- Tiempo en más o en menos para la lectura (menos de 15 hs. y más de 18 hs.).

Pruebas de sensibilidad directas (con materiales clínicos):

Cuando hay urgencia pueden efectuarse, pero deben confirmarse los resultados preliminares con la técnica común.

Materiales en que pueden efectuarse:

- Líquido cefalorraquídeo.
- Muestras purulentas.
- Líquidos que no pasan por zona séptica.

Este tipo de antibiograma está sujeto a grandes errores por:

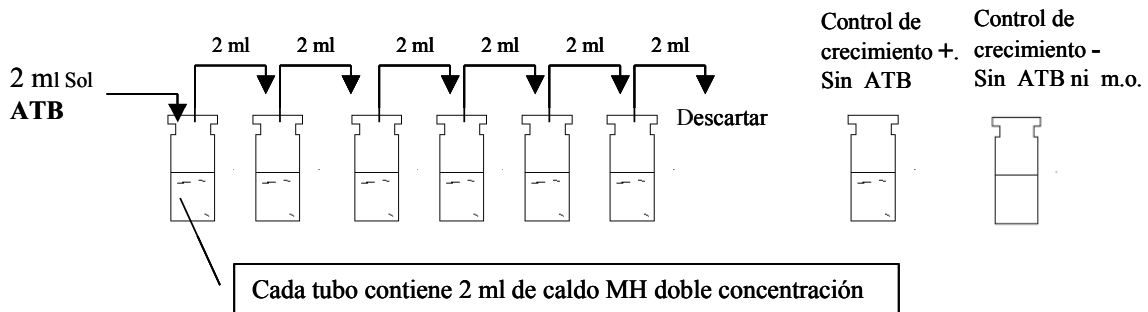
1. No hay seguridad de incluir sólo una especie microbiana.
2. No se puede standardizar el inóculo.
3. Presencia de inhibidores en los líquidos clínicos que potencien o inactiven algún antibiótico.

## Pruebas de Antibiograma - Dilución en caldo

### A) Preparación suspensión del microorganismo



### B) Preparación diluciones ATB - Caldo MH.



### C) Siembra

Agregar a todos los tubos (excepto control -), 2 ml de la suspensión preparada en A)

Incubar a :35 - 37°C, 24 Hs. en Atm Normal

### D) Determinación de la CIM y la CBM

