

7. Cálculo de la concentración mínima inhibitoria de un antibiótico mediante el método de dilución en caldo

7.1 Introducción

Una práctica habitual en medicina consiste en el aislamiento en cultivo puro de microorganismos a partir de pacientes enfermos con el objeto de confirmar el diagnóstico y ayudar a tomar decisiones sobre la terapia a seguir. Por ello, determinar la sensibilidad de los microorganismos aislados frente a agentes antimicrobianos es una de las tareas más importantes del microbiólogo clínico. Por otro lado, la expansión de los mecanismos de resistencia a drogas ha traído como consecuencia que los microorganismos productores de algunas enfermedades infecciosas clásicas no respondan a los tratamientos tradicionales, por lo que es necesario determinar la efectividad de estos tratamientos clásicos y su sustitución por otros alternativos. Asimismo, cuando se encuentra una nueva sustancia con actividad antimicrobiana, es necesario conocer la sensibilidad de diferentes microorganismos frente a ella y compararla con la de los agentes ya conocidos. Entre las técnicas más empleadas a la hora de conocer la sensibilidad de microorganismos frente a agentes químicos están la técnica de difusión en agar o método de Kirby-Bauer, que ya fue utilizada en las prácticas de la asignatura de Microbiología de 3º, y el cálculo de la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante el método de la dilución del agente en caldo.

7.2 Objetivos

El objetivo de esta práctica es determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante el método de la dilución en caldo de dos antibióticos con blancos de acción distintos, la ampicilina y el cloranfenicol, frente a dos bacterias diferentes, una Gram positiva y otra negativa.

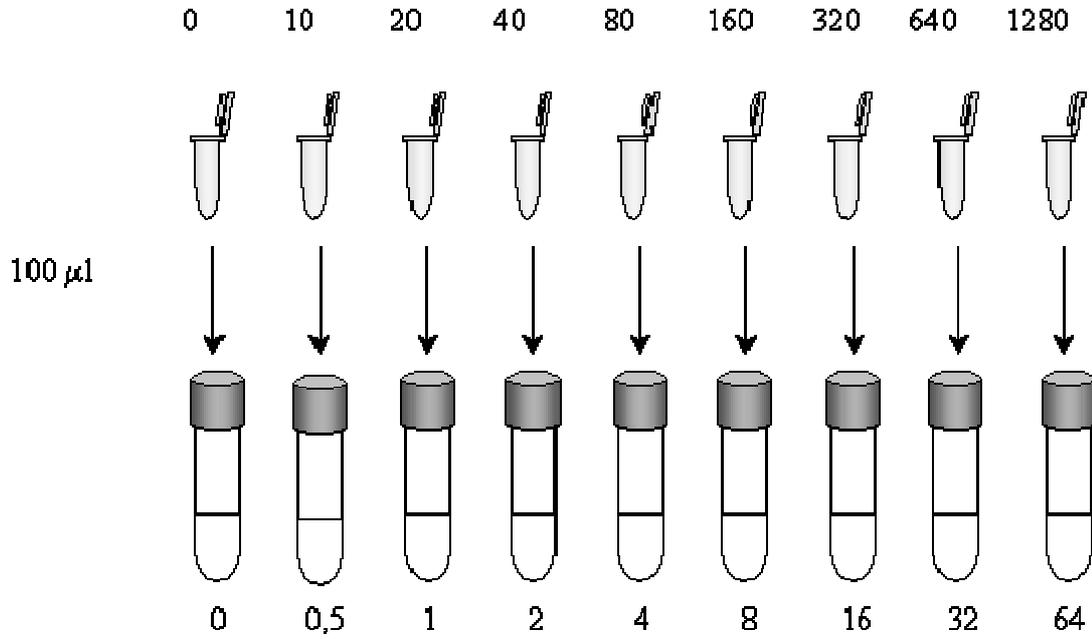
7.3 Material necesario

- Cultivos de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* con densidades celulares de aproximadamente 5×10^5 cel/ml.
- Tubos con 2 ml de caldo TSB
- Soluciones de ampicilina y cloranfenicol a concentraciones de 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 y 1280 µg/ml
- Micropipetas de 100 µl y puntas de micropipeta estériles.

7.4 Técnica

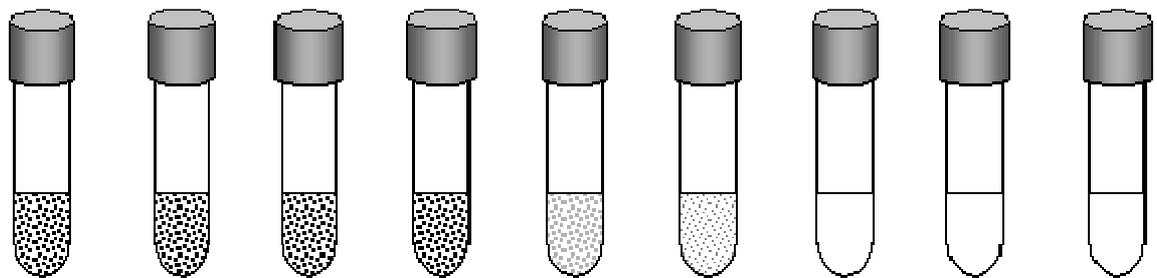
Para determinar la concentración mínima inhibitoria de un antibiótico frente a una bacteria determinada hay que preparar una serie de tubos con medio de cultivo líquido, como el TSB, que contengan diluciones seriadas al doble del antibiótico a ensayar. Para ello, se toman 9 tubos por cada bacteria y antibiótico a ensayar y se marca cada uno con el nombre de la bacteria, el antibiótico y la concentración final de antibiótico, que va a

oscilar entre 0,5 y 64 $\mu\text{g/ml}$. Asimismo, un tubo se marcará como cero, ya que no contendrá antibiótico. Al tubo marcado como 0,5 se le adicionarán 100 μl de la solución que contiene 10 $\mu\text{g/ml}$ de antibiótico; al tubo marcado como 1 se le adicionarán 100 μl de la solución de antibiótico que contiene 20 $\mu\text{g/ml}$, y así sucesivamente hasta preparar cada dilución. Al tubo marcado como 0 se le adicionarán 100 μl de agua estéril. Una vez preparados todos y cada uno de los tubos, se adicionarán 100 μl de la bacteria a ensayar, y se incubarán a 37°C durante 24 h.



7.5 Interpretación de los resultados

Tras 24 h de incubación se observa la turbidez existente en cada uno de los tubos inoculados y se considera como que hay crecimiento en todos aquellos tubos en donde se aprecie turbidez, aunque no sea tan intensa como en el tubo control. Se considera que no hay crecimiento en aquellos tubos en donde no se observa turbidez alguna. La concentración mínima inhibitoria (CMI) de un antibiótico frente a una determinada bacteria será la más diluida de todos los tubos en donde no se observa crecimiento alguno.



En la siguiente tabla, marcar con una cruz los cuadros en donde se observa crecimiento:

CMI

Bacteria	Antibiótico	Concentración de antibiótico en $\mu\text{g/ml}$								
		0	0,5	1	2	4	8	16	32	64
<i>E. coli</i>	Ampicilina									
	Cloranfenicol									
<i>S. aureus</i>	Ampicilina									
	Cloranfenicol									

En función de los datos obtenidos en la anterior tabla, podemos escribir la CMI para cada pareja antibiótico-bacteria:

CMI de la ampicilina para <i>E. coli</i> :	$\mu\text{g/ml}$
CMI del cloranfenicol para <i>E. coli</i> :	$\mu\text{g/ml}$
CMI de la ampicilina para <i>S. aureus</i> :	$\mu\text{g/ml}$
CMI del cloranfenicol para <i>S. aureus</i> :	$\mu\text{g/ml}$