

- Introducción
- Objetivo
- Fundamento
- Procedimiento
- Resultados
- Observaciones

Trabajo Práctico Nº 3

DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LAS BACTERIAS A LOS ANTIBIOTICOS (ANTIBIOGRAMA)



INTRODUCCIÓN

La resistencia de las bacterias es el principal obstáculo para la eficacia terapéutica de los antibióticos, pues no sólo puede anular la acción curativa si se manifiesta en el curso del tratamiento, sino que tiene a la larga consecuencias todavía más graves para el conjunto de la población, ya que provoca la desaparición de las cepas susceptibles y la propagación de las resistentes. Ese es el motivo por el cual la determinación de la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos haya adquirido tanta importancia y sea indispensable para hacer de los antibióticos un uso racional y para preservar la eficacia de este grupo tan valioso de agentes terapéuticos.

El conocimiento de la sensibilidad a los antibióticos, del microorganismo causante de una enfermedad, no es sólo importante para hacer la selección inicial del agente terapéutico correspondiente, sino que además en aquellos casos en los cuales el paciente presente intolerancia a determinado fármaco, permite seleccionar el más adecuado para ese paciente en particular.

Los antibiogramas son métodos in vitro que determinan la susceptibilidad de los microorganismos a una variedad de agentes antimicrobianos, bajo condiciones de laboratorio específicas y estandarizadas. La meta principal del estudio de susceptibilidad es proveer al clínico algunas recomendaciones sobre la terapia que puede ser más apropiada en pacientes con una infección específica. No obstante, la correlación exacta entre los resultados in vitro y la respuesta clínica es muchas veces difícil de predecir, ya que existen numerosos factores que influyen la interacción de los agentes antimicrobianos y los microorganismos en un determinado paciente. Entre los factores podemos resaltar:

- Factores del agente antimicrobiano
 - Farmacocinética
 - Unión a proteínas del plasma
 - Vías de administración
 - Acción bacteriostática o bactericida
 - Concentración en el sitio de la infección
- Factores del huésped
 - Enfermedad
 - Estado inmunológico
 - Formación de absceso
 - Presencia de cuerpo extraño
 - Función renal y hepática
 - Cumplimiento del tratamiento
- Factores del microorganismo
 - Virulencia
 - Alta concentración de microorganismos
 - Infección mixta
 - Desarrollo de resistencia durante el tratamiento

La metodología usada para realizar el antibiograma toma en consideración algunos de estos factores para determinar más eficientemente cómo un microorganismo podría responder in vivo a un determinado antibiótico.

Existen diversos métodos para determinar la sensibilidad bacteriana a los antibióticos, presentando además cada uno de estos métodos, múltiples variantes.

Cualquiera que sea el método seleccionado, el medio de cultivo a emplear ha de ser aquel que permita un buen desarrollo del microorganismo cuya sensibilidad se determina y además no debe ejercer ningún efecto inhibitor sobre la actividad antibacteriana de los antibióticos o quimioterápicos ensayados.

Usualmente se utiliza el agar de Mueller-Hinton en las pruebas de sensibilidad de microorganismos aeróbicos de rápido crecimiento. Cuando se trata de estreptococos u otros microorganismos exigentes, se le añade al Mueller-Hinton, 5% de sangre desfibrinada.

De los métodos existentes, el más popular es el del disco de papel. La variante más utilizada de este método es la de Kirby Bauer, la cual consiste en utilizar una sola concentración de antibiótico y medir el tamaño de la zona de inhibición.

OBJETIVO

Realizar un ensayo de sensibilidad de un cultivo bacteriano a los antibióticos, usando el método de Kirby Bauer. Interpretar los resultados y hacer el informe correspondiente.

FUNDAMENTO

En el método de Kirby Bauer, el microorganismo es inoculado en la superficie de una placa de agar, sobre el cual se colocan discos impregnados con una concentración conocida del antibiótico. Las placas se incuban por 16-18 horas a 35-37°C. Durante la incubación, el antibiótico difunde radialmente desde el disco a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco. En un punto determinado, la concentración del antibiótico en el medio es incapaz de inhibir al germen en estudio. El diámetro del área de inhibición alrededor del disco puede ser convertido a las categorías de sensible, intermedio o resistente (S, I, o R) de acuerdo a tablas publicadas por los organismos encargados del control de tales métodos, por ejemplo el Comité Nacional de Estandar de Laboratorios Clínicos de los Estados Unidos de Norteamérica (National Committee for Clinical Laboratories Standards).

PROCEDIMIENTO

Para obtener resultados confiables y reproducibles mediante este método, es imprescindible seguir fielmente las instrucciones que daremos a continuación:

1. Funda el medio de cultivo y déjelo enfriar a 45-50°C.
2. Vierta asépticamente suficiente cantidad de medio de cultivo en una placa de Petri, para obtener una capa de 4 mm de espesor. Para una placa de 10

cm. de diámetro se requieren 30 mL de medio y para una de 15 cm se requieren 70 mL.

3. Deje solidificar el medio de cultivo y luego seque las placas durante 30 minutos antes de usarlas para la inoculación.
4. Inocule la placa mediante un hisopo estéril utilizando una suspensión del germen de 18 a 24 horas de incubación con una turbidez equivalente a $1,5 \times 10^6$ bacterias (Equivale al tubo No. 5 de la escala de Mc Farland). Para la inoculación sumerja un hisopo estéril en el cultivo y elimine el exceso rotándolo firmemente contra la pared interna del tubo. Frote el hisopo sobre la superficie del medio de cultivo.
5. Repita esta operación por tres veces sucesivas, rotando la placa para obtener una dispersión uniforme del inóculo en toda la superficie.
6. Coloque la tapa a la placa y deje secar el inóculo por 3 a 5 minutos.
7. Coloque los discos con los antibióticos sobre el agar mediante pinzas estériles o usando un aplicador de discos. Oprima los discos suavemente con una pinza para asegurar un buen contacto con el medio de cultivo. Los discos deben estar espaciados de manera que su distancia a la pared de la placa sea de 15 mm y entre ellos de 30 mm.



8. Incube a $35 - 37^{\circ}\text{C}$ hasta el siguiente día (aproximadamente 18-19 horas). Si se requieren los resultados con rapidez se pueden leer las zonas de inhibición después de 6-8 horas de incubación, pero estos resultados deben ser confirmados mediante una nueva lectura después de la incubación por las 18 -19 horas.
9. La medida del diámetro de la zona de inhibición se hace preferentemente desde el exterior de la placa, sin quitar la tapa, esto puede hacerse con una regla milimetrada, un vernier o cualquier otro Instrumento similar.
10. Los resultados se interpretan de acuerdo con la tabla 1.

11. Ensayos de control con microorganismos cuya sensibilidad se conoce, tales como el *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922, deben ser efectuados simultáneamente con el de los gérmenes en estudio y las zonas de inhibición obtenidas con ellos deben estar comprendidas entre los valores indicados en la tabla 2.

TABLA 1. INTERPRETACIÓN DEL MÉTODO DE KIRBY BAUER

| Agente antimicrobiano | Contenido del disco | Diámetro de la zona de inhibición en mm | | |
|---|---------------------|---|------------|-------------------|
| | | Resistente < o = | Intermedio | Sensible > o = |
| BETALACTÁMICOS, PENICILINAS | | | | |
| Ampicilina <i>Enterobacteriaceae</i> | 10 µg | 13 | 14-16 | 17 |
| Ampicilina Estafilococos | 10 µg | 28 | --- | 29 |
| Ampicilina Enterococos | 10 µg | 16 | --- | 17 |
| Ampicilina Estreptococos β hemolíticos | 10 µg | 18 | 19-25 | 26 |
| Mezlocilina <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 75 µg | 15 | --- | 16 |
| Mezlocilina <i>Enterobacteriaceae</i> | 75 µg | 17 | 18-20 | 21 |
| Oxacilina Estafilococos | 1 µg | 10 | 11-12 | 13 |
| Oxacilina Neumococos para evaluar sensibilidad a penicilina | 1 µg | --- | --- | 20 |
| Penicilina G Estafilococos | 10 U | 28 | --- | 29 |
| Penicilina Enterococos | 10 U | 14 | --- | 15 |
| Penicilina Estreptococos β hemolíticos | 10 U | 19 | 20-27 | 28 |
| Piperacilina <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 100 µg | 17 | --- | 18 |
| Piperacilina <i>Enterobacteriaceae</i> | 100 µg | 17 | 18-20 | 21 |
| COMBIN. CON INHIBIDORES B-LACTAMASA | | | | |
| Amoxicilina / Acido Clavulánico Estafilococos | 20/10 µg | 19 | --- | 20 |
| Amoxicilina / <i>Enterobacteriaceae</i> | 20/10 µg | 13 | 14-17 | 18 |
| Ampicilina / Sulbactama | 10/10 µg | 11 | 12-14 | 15 |
| Piperacilina / Tazobactama Enterobacterias | 100/10 µg | 17 | 18-20 | 21 |
| Piperacilina / <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 100/10 µg | 17 | --- | 18 |
| Piperacilina / Esfafilococos meticilina S | 100/10 µg | 17 | --- | 18 |
| CEFALOSPORINAS | | | | |
| Cefaclor | 30 µg | 14 | 15-17 | 18 |
| Cefazolina | 30 µg | 14 | 15-17 | 18 |
| Cefepima | 30 µg | 14 | 15-17 | 18 |
| Cefixima | 5 µg | 15 | 16-18 | 19 |
| Cefoperazona | 75 µg | 15 | 16-20 | 21 |
| Cefotaxima | 30 µg | 14 | 15-22 | 23 |
| Cefoxitina | 30 µg | 14 | 15-17 | 18 |
| Ceftazidima | 30 µg | 14 | 15-17 | 18 |
| Ceftixozima | 30 µg | 14 | 15-19 | 20 |
| Ceftriaxona | 30 µg | 13 | 14-20 | 21 |
| Cefuroxima sódica parenteral | 30 µg | 14 | 15-17 | 18 |
| Cefalotina | 30 µg | 14 | 15-17 | 18 |

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA – ANTIBIOGRAMA

| CARBAPENEMS | | | | |
|-------------------------------|---------------|-----|--------|----|
| Imipenem | 10 µg | 13 | 14-15 | 16 |
| Meropenem | 10 µg | 13 | 14-15 | 16 |
| MONOBACTAMAS | | | | |
| Aztreonam | 30 µg | 15 | 16-21 | 22 |
| GLICOPÉPTIDOS | | | | |
| Teicoplanina | 30 µg | 10 | 11-13 | 14 |
| Vancomicina Enterococos | 30 µg | 14 | 15-16 | 17 |
| Vancomicina Estafilococos | 30 µg | --- | --- | 15 |
| AMINOGLUCÓSIDOS | | | | |
| Amicacina | 30 µg | 14 | 15-16 | 17 |
| Gentamicina | 10 µg | 12 | 13-14 | 15 |
| Kanamicina | 30 µg | 13 | 14-17 | 18 |
| Netilmicina | 30 µg | 12 | 13-14 | 15 |
| MACRÓLIDOS | | | | |
| Azitromicina | 15 µg | 13 | 14-17 | 18 |
| Claritromicina | 15 µg | 13 | 14-17 | 18 |
| Eritromicina | 15 µg | 13 | 14-22 | 23 |
| TETRACICLINAS | | | | |
| Minociclina | 30 µg | 14 | 15-18 | 19 |
| Tetraciclina | 30 µg | 14 | 15-18 | 19 |
| QUINOLONAS | | | | |
| Ciprofloxacina | 5 µg | 15 | 16-20 | 21 |
| Fleroxacina | 5 µg | 15 | 16-18 | 19 |
| Nalidixico Ácido | 30 µg | 13 | 14-18 | 19 |
| Norfloxacina | 10 µg | 12 | 13-16 | 17 |
| Ofloxacina | 5 µg | 12 | 13-15 | 16 |
| Trovafloxacina | 10 µg | 13 | 14-16 | 17 |
| OTROS ANTIMICROBIANOS | | | | |
| Cloranfenicol | 30 µg | 12 | 13-17 | 18 |
| Clindamicina | 2 µg | 14 | 15-20 | 21 |
| Nitrofurantoína | 300 µg | 14 | 15-16 | 17 |
| Polimixina B | 300 U | 8 | 9 - 11 | 12 |
| Rifampicina | 5 µg | 16 | 17-19 | 20 |
| Sulfonamidas | 300 µg | 12 | 13-16 | 17 |
| Trimetoprima - Sulfametoxazol | 1.25/23.75 µg | 10 | 11-15 | 16 |

OBSERVACIONES

Compare los resultados obtenidos por Ud. con los de algunos de sus compañeros. Anote sus conclusiones.

BIBLIOGRAFÍA

Clavell, L.; Pedrique de Aulacio, M. 1992. Microbiología. Manual de Métodos Generales. Segunda edición. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela.

Palavecino Rosales E. 1997. Boletín Escuela de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile. 1997;26:156-160.

URL: http://www.britanialab.com.ar/k07_04.html

Prof. Magaly Pedrique de Aulacio
Febrero 2002