

CAPÍTULO 6

Florencia Laura Pantozzi

Métodos Básicos de detección de la Sensibilidad Antimicrobiana en el Laboratorio de Bacteriología

Metodología de la Prueba de Difusión en Agar con Discos

El agar Müller Hinton, se considera el mejor de los medios disponibles para las pruebas de sensibilidad de rutina por demostrar buena reproducibilidad lote a lote, tener bajo contenido de inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclinas, adecuado para el desarrollo de la mayoría de las bacterias patógenas y por la existencia de muchos datos y experiencia recopilados que avalan las pruebas de sensibilidad realizadas con este medio.

Preparación del medio

Se realiza a partir de la base deshidratada, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Inmediatamente después de esterilizar se deja enfriar en baño de agua hasta 45-50°C para luego colocarlo en placas de vidrio o plástico de piso plano hasta un espesor de 4 milímetros. Esto corresponde entre 25 a 30 ml para las placas de Petri de 100 milímetros de diámetro interno. Posteriormente dejar enfriar a temperatura ambiente antes de usar. Las placas que no se usan en el día pueden mantenerse en refrigerador (2-8°C) hasta 7 días en bolsas de plástico cerradas para evitar la desecación. Debe realizarse un control de esterilidad de cada lote de placas incubando una muestra representativa por el término de 24 horas a 30-35°C.

pH

El agar debe tener un pH de 7,2-7,4 a temperatura ambiente y debe determinarse después de su solidificación. Si el pH es demasiado bajo aminoglucósidos, quinolonas y macrólidos parecerán menos activos mientras tetraciclinas parecerán tener mayor actividad. Si el pH es demasiado alto se podrían esperar los efectos opuestos.

Se deja solidificar la cantidad necesaria de agar Müller Hinton alrededor del bulbo del electrodo del pHmetro de modo que quede cubierto y se mide.

Humedad

Las placas no deben presentar exceso de humedad en la superficie. Si esto ocurre se deben colocar abiertas en estufa a 35-37°C o en cabina de flujo laminar durante 10 a 30 minutos.

Controles de calidad internos

El objetivo de un programa de control de calidad es el monitoreo de la reproducibilidad de las PSA basado en la exactitud y precisión, la calidad de los reactivos usados en el ensayo y el desempeño de las personas que llevan a cabo las pruebas.

Control Calidad del agar Müller Hinton

Efecto de la Timina o Timinida

Los medios que contienen excesiva cantidad de timina o timidina pueden revertir los efectos inhibitorios de las sulfonamidas y trimetoprima, produciendo así zonas más pequeñas, menos nítidas o sin halo que pueden dar como resultado un informe de falsa resistencia. Para evaluar cada lote de agar Müller Hinton en su contenido de timidina se debe utilizar una cepa control de *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212 o ATCC® 33186 que se prueba frente a discos de trimetoprima/sulfametoxazol. Un medio adecuado mostrará un halo de inhibición claro y definido de 20 mm o más. En los medios con alto contenido en timidina se observarán zonas de inhibición con colonias dentro del halo, menores de 20 mm o sin zona de inhibición.

Efectos por variación en la composición de cationes divalentes

La variación de cationes divalentes, principalmente Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ afectarán los resultados con tetraciclinas y aminoglucósidos frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Un excesivo contenido en cationes reducirá la zona de inhibición, mientras que bajas concentraciones producirán en efecto contrario. Un exceso de Zinc⁺⁺ podrá reducir las zonas de inhibición de los carbapenemes. Para estos controles debe utilizarse la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853.

Control de Calidad de los Antimicrobianos

Los diámetros de los halos de inhibición para las cepas de referencia deben estar dentro de los límites establecidos en la tabla correspondiente del documento del CLSI 2013, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* Tabla 3A, en la siguiente página:

file:///C:/Users/Admin/Documents/Downloads/CLSI2013.pdf

Cepas de referencia para control de calidad

Escherichia coli ATCC® 25922, *Escherichia coli* ATCC® 35218 productora de β-lactamasa, *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212 ó 33186 se utilizan para controlar los niveles de timina o timidina en el agar Müller Hinton y se utiliza también para controlar los discos de alta carga de aminoglucósidos (gentamicina 120 µg y estreptomina 300 µg), *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 700603 se usa como control de calidad en la determinación de β-lactamasa de Espectro Extendido o BLEE.

Almacenamiento de los discos de antimicrobianos

Los envases comerciales están diseñados para proteger de la humedad a los discos de papel para pruebas de sensibilidad. Los mismos deberán mantenerlos refrigerados a 8°C o en freezer a -14°C o menos. Los discos que contienen drogas de la familia de β-lactámicos deben mantenerse congelados para conservar su potencia, dejando en la heladera sólo el envase que está siendo utilizado. Las drogas más inestables, como β-lactámicos más inhibidores de β-lactamasa, entre otros, deben ser mantenidos congelados hasta el día de uso. Los discos deben ser sacados del refrigerador o freezer 1 o 2 horas antes, a fin de lograr un equilibrio con la temperatura ambiente antes de ser abiertos. Una vez que el cartucho fue abierto debe ser colocado en un contenedor hermético que contenga una sustancia desecante apropiada. Deben usarse sólo los discos que no alcanzaron la fecha de vencimiento indicada por los fabricantes y que hayan pasado el control de calidad interno.

Turbidez estándar para la preparación del inóculo

Para la densidad del inóculo se usa una suspensión de Sulfato de Bario como estándar de turbidez, que corresponde al 0.5 de la escala de McFarland o su equivalente óptico de suspensión de partículas de látex. Para este procedimiento utilice luz adecuada y mire los tubos contra un fondo blanco con líneas negras como contraste. También pueden utilizarse equipos fotométricos.

Preparación del estándar 0.5 de McFarland

Agregue 0,5ml de BaCl₂ 0.048M (1,175% P/V BaCl₂ 2H₂O) a 99,5ml de H₂SO₄ 0,18M (1%V/V). Mientras se agrega el BaCl₂ mantener la suspensión en agitación continua. Verificar la densidad correcta del estándar usando un espectrofotómetro con un paso de luz de 1 cm. El estándar 0,5 McFarland debe presentar una absorbancia de 0,08-0,10 a 625 nm. Luego, se distribuye 4 a 6 ml de la suspensión obtenida dentro de tubos similares a los que va a usar para preparar los inóculos. Mantener los estándares herméticamente cerrados a temperatura ambiente y al abrigo

de la luz. Antes de su uso para lograr una turbidez homogénea agitar vigorosamente; y reemplazar los estándares o verificar la densidad de los mismos mensualmente.

Procedimiento para la realización de la Prueba de Difusión con Discos

Preparación del inóculo

Método de desarrollo previo

De la placa de cultivo de 18 a 24 horas de incubación, seleccione 3 a 5 colonias aisladas de igual morfología. Prepare una suspensión en 4 o 5 ml de caldo tripteína soya o similar, tocando la parte superior de cada colonia. Incube a 35-37°C hasta que éste alcance o exceda la turbidez del estándar, 2-6 horas, y ajuste la turbidez del inóculo con solución fisiológica o caldo hasta que su densidad óptica se asemeje a la del tubo 0,5 de la escala de McFarland. Esta suspensión contendrá aproximadamente 1 a 2 x 10⁸ UFC/ml para *Escherichia coli* ATCC® 25922. Para ajustar la densidad del inóculo se pueden utilizar equipos fotométricos o por comparación visual contra el estándar. Para este procedimiento utilizar luz adecuada y mire los tubos contra un fondo blanco con líneas negras como contraste.

Método directo de inoculación a partir de colonia aislada

De la placa de cultivo no selectivo, agar tripteína soya o agar sangre, después de 18 a 24 horas de incubación, seleccionar 3 a 5 colonias aisladas de igual morfología. Prepare una suspensión de solución fisiológica tocando la parte superior de cada colonia y ajuste la turbidez del inóculo con solución fisiológica hasta que su densidad óptica se asemeje a la del tubo 0,5 de la escala de McFarland. Esta suspensión contendrá aproximadamente 1 a 2 x 10⁸ UFC/ml para *Escherichia coli* ATCC® 25922. Para este procedimiento utilice luz adecuada y mire los tubos contra un fondo blanco con líneas negras como contraste.

Inoculación de las placas

Se debe realizar dentro de los 15 minutos después de ajustado el inóculo. Se siembran las placas de Müeller Hinton con un hisopo estéril. Presionar el hisopo contra las paredes del tubo por encima del nivel líquido a fin de escurrir el exceso de inóculo.

Inocular la superficie seca del agar por hisopado en tres direcciones, rotando la placa 60° cada vez para asegurar una completa distribución del inóculo. Como paso final se debe hisopar

la circunferencia de la placa. De esta manera se deberían obtener zonas de inhibición uniformemente circulares y desarrollo homogéneo.

Dejar la tapa de la placa abierta de 3 a 5 minutos, máximo 15, antes de aplicar los discos para que el exceso de humedad superficial sea absorbido.

Importante: nunca use cultivos *overnight* en medio líquido ni otros inóculos no estandarizados para el hisopado de las placas.

Aplicación de los discos de antibióticos en las placas inoculadas

Colocar los discos distribuidos uniformemente sobre la superficie del agar inoculada con pinza estéril o dispensador, aplicando una ligera presión a una distancia no menor a 24 mm desde el centro al otro. Debido a que algunas drogas difunden casi instantáneamente, un disco no debe ser reubicado una vez que tomó contacto con la superficie del agar. No deben colocarse más 5 por placa de 100 milímetros. Incubar las placas invertidas a 35-37°C dentro de los 15 minutos posteriores a que los discos fueron aplicados.

Método de difusión en agar con discos

Condiciones básicas para su realización

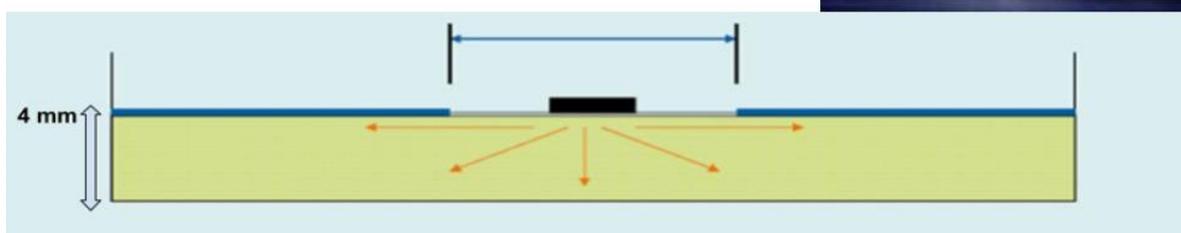
Medio de cultivo: agar Müller Hinton

Altura del agar en la placa: 4 mm

Inóculo: equivalente a 0,5 de la escala de Mc Farland

Sembrar toda la superficie del agar para asegurar una completa distribución del inóculo

Colocación del disco para cada antimicrobiano



Lectura de las placas e interpretación de resultados

Después de 16 a 18 horas de incubación examinar cada placa y medir los diámetros de las zonas de inhibición, incluyendo el diámetro del disco, utilizando calibre o regla, sosteniendo la placa sobre un fondo negro e iluminada con luz reflejada.

El desarrollo bacteriano en la placa deberá ser confluyente, la aparición de colonias aisladas indica un inóculo bajo por lo que el ensayo debe repetirse. El diámetro de la zona de inhibición obtenido está muy influenciado por la densidad del inóculo bacteriano aplicado, lo cual respalda la exigencia de estandarizarlo. Si se aplica un inóculo más denso de lo previsto, se obtendrán

zonas de inhibición más pequeñas, y si es más escaso se obtendrán zonas de inhibición más grandes.

El punto final deberá tener en cuenta el área que no muestre desarrollo obvio a ojo desnudo, no incluyendo velo de crecimiento o colonias muy pequeñas. Las colonias de tamaño significativo que crezcan dentro de la zona clara deberán ser subcultivadas, reidentificadas y reensayadas. *Proteus* spp. podría presentar *swarming* dentro de la zona de inhibición lo que deberá ser ignorado. En medios suplementados con sangre, se deberá medir la zona de inhibición del crecimiento, no la zona de hemólisis, Ej. *Streptococcus* spp.

Los tamaños de la zona de inhibición serán interpretados en las tablas correspondientes y los organismos se informarán sensibles, intermedios o resistentes frente al antimicrobiano ensayado.

Microorganismos con requerimientos nutricionales especiales

Cuando se deban probar microorganismos con requerimientos nutricionales especiales, se utilizará agar Müeller Hinton suplementado el medio, los procedimientos de control de calidad y las categorías de interpretación deben ser adaptados para cada uno de ellos (*Streptococcus* spp. y *Actinobacillus* spp.).

***Streptococcus* spp.**

El medio recomendado es el agar Müeller Hinton suplementado con 5% de sangre de carnero desfibrinada.

***Actinobacillus* spp.**

El medio recomendado es el agar Müeller Hinton–Chocolate en atmósfera del 5 - 7% de CO₂.

Método de Determinación de la Sensibilidad Antimicrobiana por Dilución

Fundamento

La finalidad de estos métodos de dilución en caldo de cultivo y en agar es determinar la concentración más baja de antimicrobiano que es capaz de inhibir el crecimiento visible de la bacteria en cuestión ya sea en caldo de cultivo o en agar, denominada concentración mínima inhibitoria o CIM.

Son utilizadas para medir cuantitativamente la actividad in vitro de un antimicrobiano frente a un cultivo bacteriano.

El intervalo de concentraciones analizadas en los métodos de dilución en general incluye el punto de corte clínico y microbiológico, con diluciones a la mitad, por encima y por debajo de esos valores, según corresponda.

Estos métodos se basan en la preparación de una serie de tubos, macrodilución, o placas con caldo, microdilución, o agar, dilución en agar; a los cuales se les agrega el ATM en distintas concentraciones. Luego se inoculan cada uno de los tubos o placas con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio. Las pruebas se examinan luego de 16 a 18 horas de incubación a 35-37°C y se determina la CIM de cada ATM frente al microorganismo ensayado. El valor de la CIM obtenido por los métodos de dilución, orienta al clínico sobre que concentración de ATM que necesita alcanzar en el sitio de infección para inhibir el microorganismo infectante. La CIM, sin embargo, no representa un valor absoluto. La CIM real puede estar entre la menor concentración de antibiótico que inhibe al microorganismo y la siguiente donde se observa desarrollo del mismo. Si para la determinación de la CIM, se utiliza la metodología más común de diluciones seriadas al medio, por Ej. 1, 2,4, 8,16 µg/ml, etc., y se determina una CIM de 16 µg/ml, el verdadero valor podría estar entre 16 y 8 µg/ml. Debe tenerse en cuenta que a pesar de realizar las pruebas de dilución bajo condiciones cuidadosamente controladas, no siempre se obtienen los mismos resultados. Por lo tanto, las determinaciones de las CIM tienen una variación inherente de ± 1 dilución.

Cuando se produce inhibición del crecimiento con la menor concentración utilizada, por Ej. 0,25 µg/ml, el verdadero valor de la CIM no se puede determinar exactamente y debe informarse como menor o igual (\leq) que dicha concentración, a la inversa ocurre cuando la inhibición del crecimiento se produce con la mayor concentración utilizada, por Ej. 512 µg/ml, donde debe informarse mayor o igual (\geq) que dicha concentración.

En el informe del resultado de la CIM al veterinario, el valor debe ser acompañado por su correspondiente interpretación, sensible, intermedio o resistente, para una combinación específica de bacteria/antimicrobiano y del o los microorganismos que se tienen en cuenta en los controles de calidad.

El método por dilución en sus diferentes variantes es utilizado, con mayor frecuencia, en laboratorios de investigación o de diagnóstico donde la cantidad de muestras recibidas lo justifique.

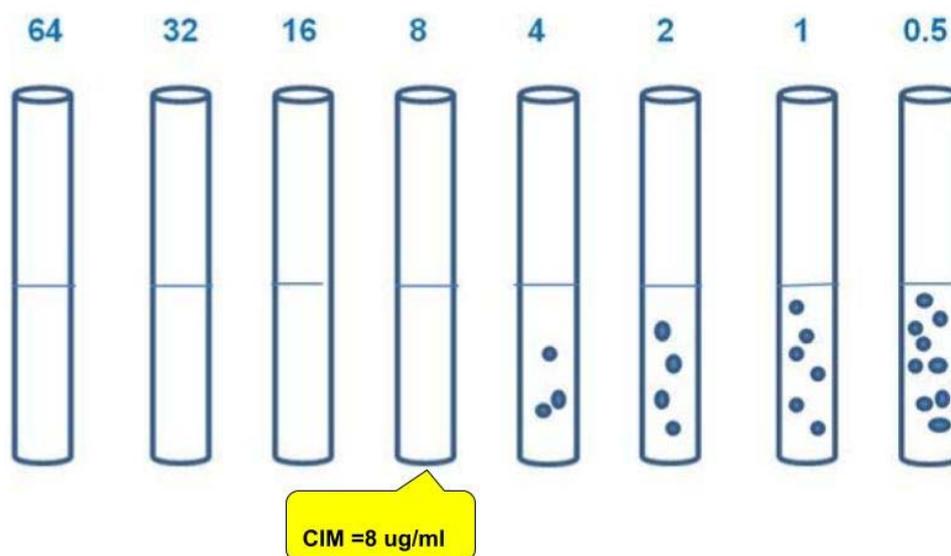
Existen en el mercado varios tipos de placas de microtitulación que contienen ATM prediluidos liofilizados o desecados dentro de los pocillos de las placas. Para facilitar la comparación de resultados entre laboratorios, es conveniente utilizar siempre los mismos lotes, lo que ayudaría a reducir al mínimo la variación que puede surgir durante la preparación y dilución de los ATM, junto a la utilización de un protocolo estandarizado que incluya la especificación de los microorganismos de referencia apropiados. Debido a que en la actualidad la mayor parte de las pruebas para antimicrobianos mediante microdilución en medio líquido se preparan comercialmente, este método es menos flexible que el basado en la dilución en medio sólido o en la difusión en disco en cuanto a su capacidad de ajuste a las posibles necesidades de cambio en el programa de control y seguimiento. Como la compra de placas antimicrobianas y de la

infraestructura necesaria puede ser costosa, esta metodología puede resultar inviable para algunos laboratorios.

Las técnicas detalladas de PSA estandarizadas de dilución en caldo, macrodilución y microdilución, y de dilución en agar, podrán encontrarlas en la siguiente página: <http://antimicrobianos.com.ar> > uploads > 2012/11metodo de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución.

Concentración inhibitoria mínima (CIM)

Es la concentración más baja de antimicrobiano que es capaz de inhibir el crecimiento visible de la bacteria en cuestión



Prueba del Gradiente de Concentración o Método Epsilométrico (E-test®)

Es una combinación entre el método de difusión en agar y el método de dilución. Consiste en una tira plástica que contiene gradientes predefinidos de concentraciones de un antimicrobiano y es usada para la determinación de la CIM. Determina 15 diluciones del antimicrobiano. Se coloca la tira sobre una placa de agar Müeller Hinton inoculada con la bacteria a estudiar estandarizada con la escala 0,5 de McFarland. Luego de 16 a 18 horas de incubación a 35-37°C aparece una elipse en la intersección del valor de la escala de la CIM expresada en $\mu\text{g/ml}$ donde la concentración del antimicrobiano inhibe el crecimiento de la bacteria. El Etest® de BioMérieux es una versión comercial de esta técnica.

Referencias

Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 2021. Terrestrial Manual Online Access. Part 2 Section 2.1. Chapter 2.1.1. Laboratory methodologies for bacterial antimicrobial susceptibility testing (version adopted in May 2019). <https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/>

Hudzicki J. 2016. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. American Society for Microbiology. <https://asm.org/getattachment/2594ce26-bd44-47f6-8287-0657aa9185ad//Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Protocol-pdf.pdf>

Método de Determinación de Sensibilidad Antimicrobiana por Dilución. Servicio Antimicrobianos. Dpto. Bacteriología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) ANLIS "DR. CARLOS G. MALBRAN". <http://antimicrobianos.com.ar/uploads/2012/11>

Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. J Pharm Anal. 6(2):71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>

BioMérieux. <https://www.biomerieux.com.ar/diagnostico-clinico/productos/etestr>