

Trabajo Práctico N° 8 Determinación de la actividad antimicrobiana.

OBJETIVOS DEL T.P.

- Determinación de la susceptibilidad a los antibióticos de distintas cepas bacterianas por el método de difusión en disco.
- Determinación de la concentración inhibidora mínima (C.I.M.).
- Determinación de la concentración bactericida mínima (C.B.M.).

CONOCIMIENTOS PREVIOS

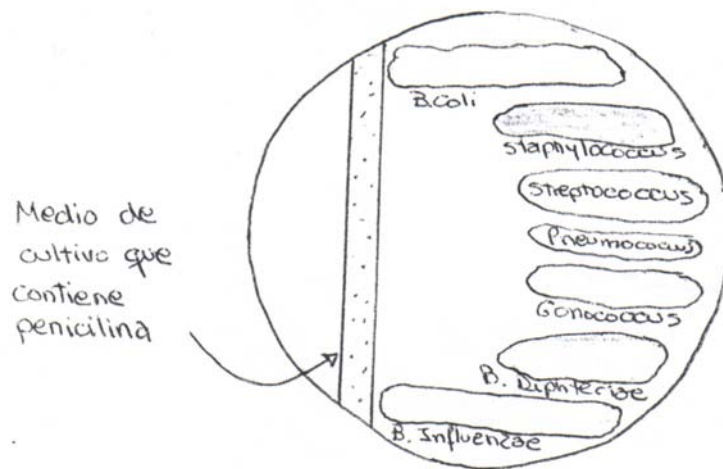
- Concepto de antibióticos, especificidad, resistencia bacteriana (tipos), espectro antibacteriano, mecanismos de acción.
- Preparación de una suspensión calibrada del microorganismo (inóculo).
- Preparación y esterilización del medio de cultivo.
- Siembra.
- Incubación.

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

La necesidad de pruebas de susceptibilidad se evidenció tan pronto como estos se volvieron comercialmente disponibles. Fue menester desarrollar algún método para predecir si un antibiótico (por ejemplo, la penicilina, cuya producción era limitada y costosa), podría potencialmente curar a un individuo que tuviera una enfermedad infecciosa. Así fue como se establecieron patrones de susceptibilidad de varios antibióticos diferentes contra diversos microorganismos.

UN POCO DE HISTORIA . . .

Fleming desarrolló el primer método para llevar a cabo pruebas de susceptibilidad a los antibióticos. Su técnica de la **placa- surco** consistió en quitar una tira de agar formándose así un surco donde se colocaba un medio que contenía penicilina. Los organismos en estudio se inoculaban en forma de estrías múltiples perpendiculares al surco. Las que desarrollaban hasta el surco se consideraban cepas **resistentes**, mientras que las que presentaban zonas de inhibición del desarrollo adyacente al surco eran consideradas **susceptibles**.



Más tarde, el desarrollo de cepas bacterianas resistentes hicieron que estas pruebas se volvieran de necesidad práctica para guiar a los médicos en el uso adecuado del antibiótico.

Actualmente la valoración de los antibióticos se lleva a cabo principalmente mediante dos métodos:

- A) Dilución en caldo.
- B) Difusión en agar.

A) DILUCION EN CALDO

El medio de cultivo es líquido. Se toman de 7 a 10 tubos de ensayo que contienen la misma cantidad de caldo nutritivo. A cada uno de ellos se le añade una cantidad de antibiótico de manera de obtener diluciones dobles y progresivas de agente antimicrobiano. Los tubos se inoculan con una suspensión calibrada del microorganismo en estudio (de manera que garantice una misma cantidad de bacterias en cada tubo) y se incuban durante 18 horas a 35°C. Uno de los tubos no contiene antibiótico y sirve como control de desarrollo o testigo.

En aquellos tubos donde la bacteria se desarrolla y multiplica aparece turbidez. En cambio cuando el antibiótico inhibe el crecimiento, la masa líquida del medio de cultivo aparece clara. Esto determina un punto de ruptura en el crecimiento bacteriano que introduce el término de **CONCENTRACION INHIBITORIA MINIMA (C.I.M.)**.

El CIM es la menor concentración de antibiótico expresada en $\mu\text{g/ml}$, que inhibe el desarrollo *in vitro* de las bacterias.

¿Qué significa la CIM para el médico? Simplemente que debe lograr esa concentración de antibiótico en el sitio de la infección para que el desarrollo bacteriano sea potencialmente inhibido. Para esto será necesaria la administración de una mayor dosis, dado que otros factores como la unión del antibiótico a proteínas séricas, la presencia de inhibidores tisulares, etc.; pueden reducir la acción antimicrobiana.

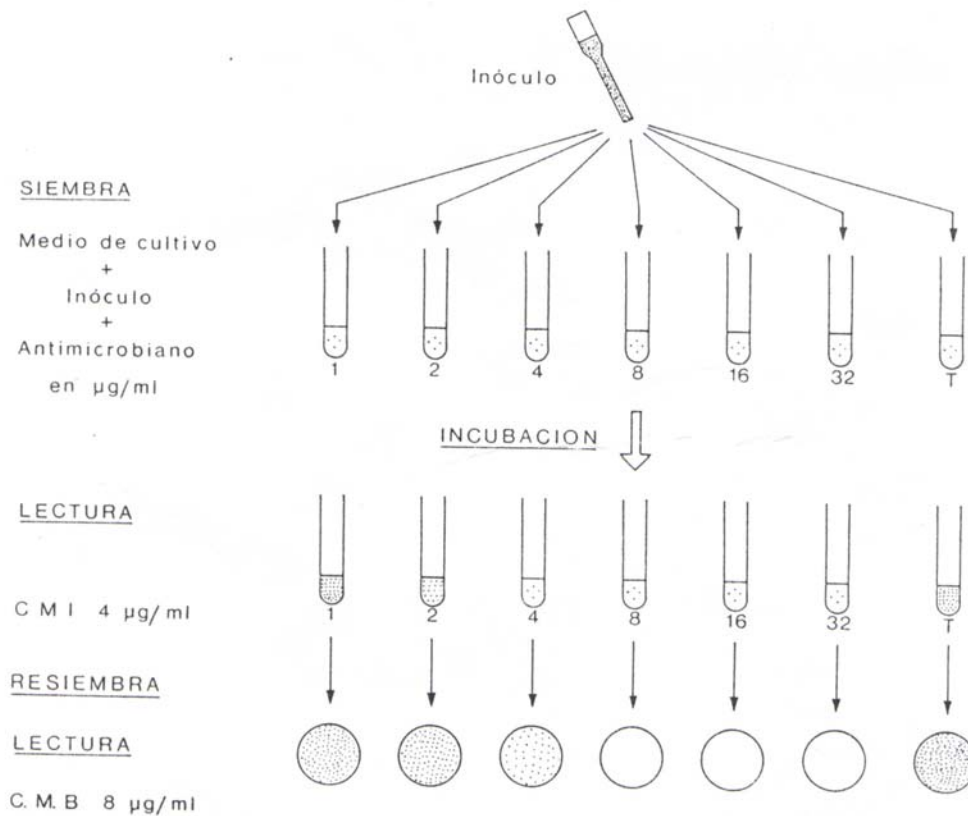
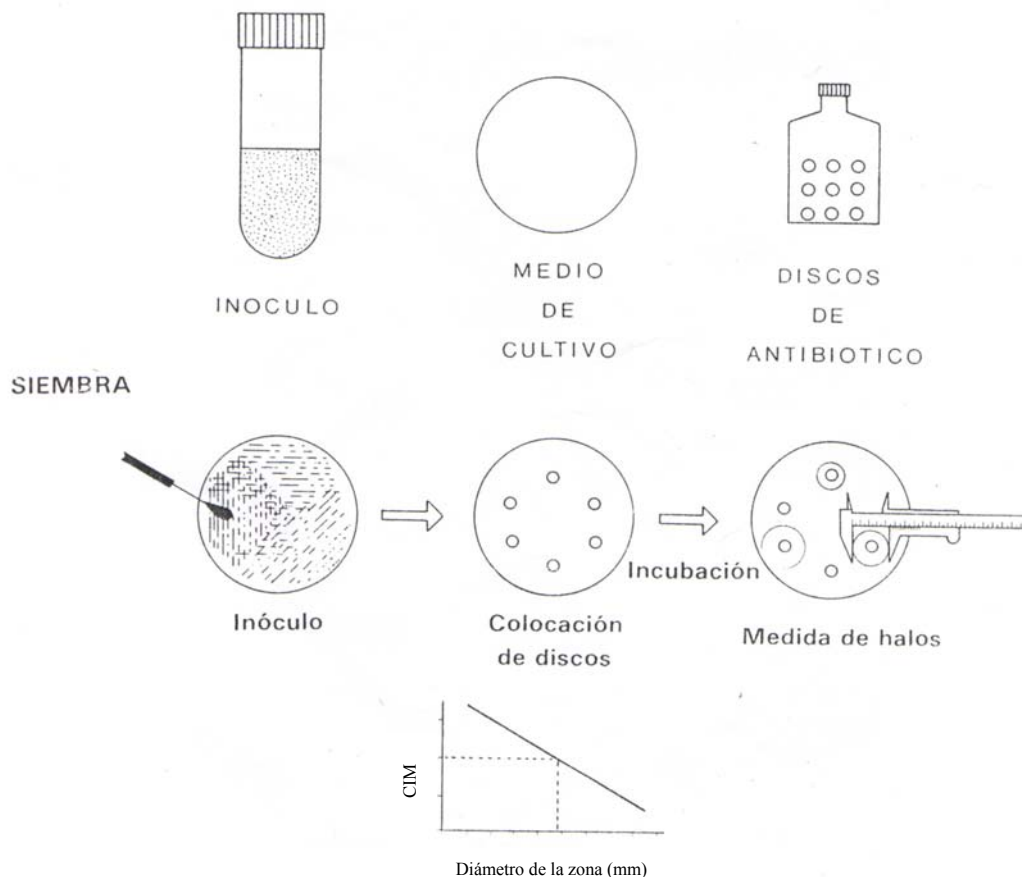


Fig. 12-10. Determinación de la CMB.

A partir de los tubos donde no se observó crecimiento se puede determinar la **CONCENTRACION BACTERICIDA MINIMA (C.B.M.)**, que es la menor concentración de antibiótico que no solo inhibe el desarrollo de las bacterias sino que también las destruye. Para esto se efectúa el subcultivo del contenido de los tubos visualmente claros en placas de agar, observándose el desarrollo o no de colonias viables. El primer tubo de la serie que al ser sembrado no da lugar al desarrollo de colonias, nos determina la CBM del antibiótico en estudio.

B) DIFUSION EN AGAR

El medio de cultivo es sólido. Este sistema permite probar la eficacia de varios antibióticos al mismo tiempo. Sobre la superficie de una placa de agar se realiza la siembra de una suspensión bacteriana calibrada y a continuación se depositan sobre ella discos de papel de filtro impregnados de antimicrobianos (discos para antibiograma disponibles en el comercio). Tan pronto como el disco toma contacto con la superficie húmeda del agar, el agua es absorbida por el papel de filtro y el antibiótico difunde hacia el medio circundante creando así concentraciones progresivamente decrecientes. Se observa como a medida que la distancia al disco aumenta hay una reducción logarítmica de la concentración del antibiótico. Así, al cabo de 18 horas de incubación, en aquella zona donde el antibiótico es capaz de impedir el crecimiento de la bacteria aparece un halo alrededor del disco: **halo de inhibición**.



Prototipo de curva de regresión comparando CIM con medidas de zonas en mm

El tamaño de la zona de inhibición depende de ciertas propiedades fisicoquímicas del antibiótico que influyen invitro sobre la velocidad de difusión en agar y no están necesariamente relacionadas con la actividad terapéutica (in vivo) del antibiótico.

La valoración de los halos se hacen por patrones obtenidos de forma que se hallan correlacionadas la CIM y la carga antimicrobiana del disco con el diámetro del halo. Para ello es necesario determinar previamente en forma individual la CIM y el halo de inhibición de un número amplio de cepas. Los resultados se representan en un sistema de coordenadas que nos permite establecer una correspondencia para un antibiótico determinado. De esta forma midiendo el diámetro del halo de inhibición de una cepa por el método del **disco-placa**, trasladamos este valor a la escala anterior y podemos conocer su CIM.

Pese a las limitaciones, esta técnica representa un avance ya que provee de resultados estandarizados comparables entre los distintos laboratorios.

TECNICA OPERATORIA CLÁSICA

MEDIO DE CULTIVO: se ha seleccionado como medio de cultivo estándar el agar de Mueller-Hinton ya que este promueve el desarrollo de la mayoría de los aislamientos bacterianos clínicamente significativos.

Es importante que el medio alcance en la placa un espesor uniforme de 4 mm. Si es más fino, los antibióticos tienden a difundir más en sentido lateral, dando halos de mayor tamaño; y un agar de más de 4 mm de espesor produce una mayor difusión del antibiótico hacia abajo con tendencia a estrechar las zonas de inhibición.

INÓCULO: la concentración bacteriana debe ser de aproximadamente 10^8 microorganismos por mililitro. Para esto, tocar con un hisopo estéril la superficie de una o varias colonias de cepas bacterianas puras (de la misma especie), luego sumergir el hisopo en 2 o 3 ml de caldo nutritivo hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar 0,5 de Mc Farland cuya turbidez corresponde a la concentración de microorganismos buscada. El estándar de Mc Farland se prepara añadiendo 0,5 ml de cloruro de bario al 1% a 99,5 ml de ácido sulfúrico 0,36 N. La comparación de turbidez entre el estándar y el caldo con el microorganismo en estudio se puede efectuar mejor mirándolos contra una cartulina blanca con líneas negras verticales y paralelas. Si la turbidez de la suspensión es menor, se debe inocular nuevamente, y si la turbidez es mayor se debe diluir con solución fisiológica hasta igualarlas.

Una vez logrado esto, sumergir un hisopo estéril y seco en la suspensión bacteriana y eliminar el exceso de líquido haciendo rotar el hisopo contra la pared interna del tubo. Inocular con ésta la superficie de una placa de agar de Mueller-Hinton a temperatura ambiente. Se sugiere estriar la superficie con el mismo hisopo en por lo menos tres direcciones girando la placa en ángulos de 60° luego de cada estría. Una vez seco el inóculo, la placa esta lista para la colocación de los discos con antibióticos.

DISCOS: pueden adquirirse en el comercio, y si bien su almacenamiento requiere refrigeración, debe estar a temperatura ambiente antes de su colocación sobre la superficie de agar. Pueden ser colocados manualmente utilizando una pinza estéril y presionando suavemente sobre la superficie de agar con la punta de la pinza o de una varilla para asegurar un contacto uniforme con el agar, cuidando de no moverlos una vez colocados en su lugar. Los discos deben colocarse a no menos de 22 mm uno del otro y a 14 mm del borde de la placa para evitar que las zonas de inhibición se superpongan o se extiendan hasta el margen de la placa.

El personal de laboratorio debe tener cuidado de no emplear discos que excedan la fecha de vencimiento.

INCUBACIÓN: colocar las placas en una estufa a 35°C . No son aconsejables las incubadoras con dióxido de carbono debido a que se puede formar ácido carbónico en la superficie del agar, provocando así una caída del pH.

Las placas deben colocarse invertidas en la incubadora de modo que la humedad o condensación que se acumule en la placa no caiga sobre la superficie de agar tratada.

El método estándar recomienda que todas las determinaciones finales se llevan a cabo exactamente a las 18 horas, pues se ha establecido que este es el período en el que la reactividad entre los microorganismos y los efectos inhibidores de los antibióticos es óptima, siendo además los bordes de las zonas de inhibición más nítidos. Si la interpretación se demora más allá de ese tiempo, se pueden producir alteraciones en el halo por desecación del agar, por deterioro del antibiótico o por sobredesarrollo de las colonias.

MEDICIÓN DE HALOS: alrededor de los discos que contienen antibióticos a los cuales el microorganismo en estudio es susceptible, aparecen zonas de inhibición: halos. Los diámetros de estas zonas se deben medir cuidadosamente por la parte posterior de la placa con una regla. Si es necesario, ubicar la placa a contraluz o utilizando una fuente de luz brillante.

Las mediciones se realizan con una aproximación de 1 mm y el operador debe tener la precaución de observar la placa siguiendo una vertical directa para evitar una lectura errónea de las marcas de la regla por el efecto de paralaje.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS: se lleva a cabo relacionando los diámetros de las zonas de inhibición y la CIM que le corresponde para el antibiótico ensayado según el cuadro que le proporcione el instructor.

TECNICA DE LA MICROCAPA

Esta técnica permite el crecimiento uniforme del microorganismo sobre el medio Mueller Hinton.

PREPARACIÓN DEL INÓCULO: Se toma una de las colonias y se la inocula en un tubo de khan conteniendo caldo nutritivo previamente esterilizado. Se lleva a incubación durante 2 horas. Es necesario que las bacterias estén en la fase logarítmica de crecimiento para que reaccionen rápido en el Antibiograma. Luego de la incubación se toma 1 microlitro de la suspensión bacteriana y se la inocula en 5 ml. de agar-agar al 1,5 %, el cual primero debe fundirse y luego mantenerse a 55 °C en un baño termostatzado.

SIEMBRA: se vierte el contenido del tubo de khan sobre la placa de petri que contiene el agar Mueller Hinton..

COLOCACIÓN DE LOS DISCOS: Una vez solidificado el medio se procede a la colocación de los multidiscos. Pueden ser colocados manualmente utilizando una pinza estéril y presionando suavemente sobre la superficie de agar con la punta de la pinza o de una varilla para asegurar un contacto uniforme con el agar, cuidando de no moverlos una vez colocados en su lugar.

ACTIVIDADES

1- Realice el siguiente informe

- a- Lista de materiales que utilizó para realizar el T.P.
- b- Anotar las observaciones hechas por el instructor que no figuren en la técnica operatoria y que considere importante.
- c- Realizar un esquema de colocación de discos.
- d- Realizar un esquema de la placa de agar luego de 18 horas de incubación.
- e- Considerar las desventajas y limitaciones del método.

2- Responda el siguiente cuestionario

1. Destaque la importancia del antibiograma en el marco de la terapia antimicrobiana. ¿Qué conclusiones le permite realizar?
2. Mencione los métodos que conoce y analice las ventajas y limitaciones de cada uno.
3. Concepto y definición de CIM y CBM. ¿Cómo se determinan experimentalmente?
4. ¿Cómo debe realizarse la colocación de monodiscos y en qué momento del ensayo?
5. Explique cómo actúan los antibióticos macrólidos
6. ¿Por qué es mejor la asociación de sulfametoxazol+trimetoprima, que la administración de cada una de ellas por separado? Explique su mecanismo de acción.
7. ¿A qué grupo de antibióticos pertenece la ampicilina? ¿Cómo actúa? Cite algún otro antibiótico de este grupo que usted conozca.
8. ¿Contra que agente infeccioso actúa el salvarsán y cómo lo hace? ¿Es un antibiótico o un quimioterápico?
9. Menciona dos causas del por qué los microorganismos pueden llegar a hacerse resistentes a los antibióticos.
10. En caso de no tener Sensidiscos en el laboratorio: ¿cómo puedes fabricarlos?