

SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIOTICOS

(PRODUCCION DE DISCOS PARA PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIOTICOS)

*Enrique de la Cruz**
*Néida Monge**

*Rafaela Madrigal**
*Ivette Peña**

*María Teresa Acuña C.**

INTRODUCCION

Aunque desde el Siglo XVII se habían empleado varias sustancias químicas para el tratamiento de las enfermedades infecciosas, la quimioterapia como ciencia empieza con Paul Erlich; posteriormente se produjo un rápido desarrollo en esa área (6, 16). Desde esa época hasta la actual, numerosos antibióticos han sido descubiertos. La prueba de sensibilidad "in vitro" a los antibióticos constituyó un gran avance de la ciencia; fue descrita por Bondi y colaboradores (5). La prueba de sensibilidad en disco recomendada por U.S. Food and Drug Administration (10) y por National Committee for Clinical Laboratory Standards (15) constituye una ligera modificación a la descrita por Bauer y co. (4). El grupo de trabajo de la O.M.S (19) recomienda utilizar sólo un representante de cada grupo de antibióticos. La droga representativa debe ser la menos activa dentro de cada grupo, de manera que el posible error que se obtenga, sea más bien por falsa resistencia que por falsa susceptibilidad. La prueba de sensibilidad en disco mide la capacidad de los antibióticos para inhibir el cre-

cimiento de los microorganismos. Los resultados correlacionan bien con la respuesta terapéutica. (11). Los resultados de la prueba de sensibilidad pueden verse afectados por el tamaño del inóculo, tiempo de incubación, temperatura, constitución del medio, pH, atmósfera, estabilidad del antibiótico y pureza del inóculo. (1, 2, 3, 7, 8, 9, 10, 17, 18, 19), por esta razón se ha tratado de estandarizar el método y obtener buena reproducibilidad. Hasta hace poco, la compra de discos para P.S.A., no constituía un problema importante. Debido a la crisis que nos enfrentamos se ha hecho más difícil su adquisición dado el alto costo que han alcanzado y la pérdida de divisas que genera su amplio uso. Es este el motivo que nos ha impulsado a preparar discos para antibiograma con nuestros propios medios.

MATERIALES Y METODOS

Para llevar a cabo el objetivo propuesto se escogieron 3 antibióticos: Cloranfenicol, Gentamicina y Ampicilina. La elección se debió a que había necesidad urgente de ellos en el Hospital San Juan de Dios. El medio empleado fue Agar Mueller Hinton ya que de buena reproducibilidad en los diferentes lotes. Las cepas control utilizadas fueron *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Satphylococcus aureus* (ATCC 25923). Para preparar los discos se utilizó papel secante y se codi-

* *Microbiólogos y Químicos Clínicos. Universidad de Costa Rica.*

ficó arbitrariamente marcándolos a máquina con las primeras letras del antibiótico, esto por cuanto en el comercio sólo existía un color de papel secante. El papel marcado fue preparado y perforado con un sacabocados, obteniéndose discos de 6 mm de diámetro los que se colocaron en recipientes de vidrio y luego fueron esterilizados. Para cerciorarse de que la tinta y el papel secante no tenían efecto inhibitorio se probaron diez discos marcados y diez sin marcar, colocándolos en platos rayados con *S. aureus* (ATCC 25923) y *E. coli* (ATCC 25922). En la preparación de las soluciones madres de antibióticos se procedió de la siguiente manera: Solución madre de Ampicilina: Se disolvió una ampolla de 500 mgs de ampicilina sódica (Laboratorio Bristol) en 100 ml de agua destilada estéril, obteniéndose una concentración de 500 mg/dl. Solución madre de Cloranfenicol: se disolvió una cápsula de 250 mg de cloranfenicol en 25 ml de alcohol metílico, se centrifugó y se tomó del sobrenadante cuya concentración final correspondía a 100 mg/dl. Solución madre de Gentamicina: una ampolla inyectable de Laboratorio Fursterg S.A., de 400 mg/dl se diluyó 1: 10 con agua destilada estéril resultando una concentración final de 400 mg/dl. A partir de las soluciones madres se realizaron diluciones para impregnar los discos, lo que se hizo con 10 ul de las diluciones, en forma estéril y con una micropipeta SMI (Scientific Manufacturing Industries) de 50 ul con graduaciones cada 10 ul. Se colocaron los discos en cajas de pe-

tri estériles distribuidos a una distancia adecuada entre ellos y se impregnaron con el antibiótico. Fueron secados a 37 C y probados según el método estándar de Bauer y Kirby (4). Se tomaron 3-10 colonias del plato inoculado con *E. coli* (ATCC 25922) y otras tantas de *S. aureus* (ATCC 25923) se introdujeron en tubos con 4.0 ml de caldo tripticase soya cada uno incubándose por 2-5 horas hasta lograr una turbidez visualmente equivalente al tubo No. 1 del standar de Mc Farland (13, 14). La suspensión fue rayada con una torunda estéril en tres planos sobre agar Mueller Hinton de 4 mm de profundidad. Una vez seco el inóculo (3-5 minutos después) los discos fueron colocados sobre el agar con pinzas flameadas y presionados sobre la superficie del gel. Luego los platos fueron incubados inmediatamente a 37 C. Después de incubar por una noche, los diámetros de los halos de inhibición fueron medidos con una regla.

RESULTADOS

Se pudo determinar que la presencia de inhibidores en el papel y en la tinta usada en los discos era negativa. Al probar las diferentes diluciones y preparadas a partir de las soluciones "madre" de cada antibiótico, se escogió aquella con la cual se obtenía los halos establecidos en Manual of Clinical Microbiology (12) correspondiendo a la Ampicilina de dilución 1:5, el Cloranfenicol 1:5 y a la Gentamicina la dilución 1:8.

CUADRO No. 1

Diámetro del halo de inhibición (en mm) obtenida para cada antibiótico con el organismo control

Antibiótico	Código	Dilución	Potencia del disco	Diámetro del halo de inhibición	
				<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922
Ampicilina	A	1:5	10 ug	35 - 30 - 32 - 32	17 - 18 - 19 - 20
Cloranfenicol	Cl	1:5	20 ug	26 - 24 - 25 - 24 - 25	26 - 24 - 21 - 23 - 22
Gentamicina	G	1:8	10 ug	24 - 22 - 21 - 23 - 21	25 - 23 - 25 - 26 - 25

Los resultados obtenidos son comparables a los señalados en el Manual of Clinical Microbiology (12) donde se establecen además los límites de precisión y exactitud para los diámetros de inhibición.

Para realizar el control de calidad se toma-

ron cinco discos de cada lote de 50 discos de cada antibiótico y los resultados obtenidos fueron analizados de acuerdo a la tabla No. 2, pág. 468, Manual of Clinical Microbiology (12). En el cuadro No. 2 se muestran los límites de control de precisión y exactitud de los diámetros de los halos de inhibición obtenidas en grupos de cinco observaciones.

CUADRO No. 2

Límites de control para precisión y exactitud de los diámetros de las zonas inhibitorias (mm) obtenidas en grupos de cinco observac.

Antibiótico y microorganismo	Cont. del disco	Diám. de la zona de la prueba de control (a)	Control de exact. del diám. de la zona en interv. de cinco valores (b)	Control de prec. rango de 5 valores.	
	(a)			Máx. (c)	Prom. (d)
E. coli ATCC 25922					
Ampicilina	10 ug	15-20	15-20	5	2.0
Cloranfenicol	20 ug	21-27	20-23	3	1.6
Gentamicina	5 ug	19-26	19-20	1	1.0
S. aureus ATCC 25923					
Ampicilina	10 ug	24-35	34-35	2	0.6
Cloranfenicol	20 ug	19-26	22-25	3	1.4
Gentamicina	5 ug	19-27	19-22	3	1.8

- a- Concentración y rango de halos establecidos.
- b- Rango de halos obtenidos experimentalmente.
- c- Valor máximo, menos valor mínimo (experimental)
- d- Promedio de la diferencia experimental.

Nota: Si para el control de calidad se usa un número mayor de cinco pruebas, estos datos se analizan de acuerdo a la tabla 4.9-1: máxima desviación estándar aceptable e intervalos en los diámetros de las zonas que se deben esperar con E. coli ATCC 25922 y S. aureus ATCC 25923 (12).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos concluir que se pudo obtener halos comprendidos dentro de los rangos establecidos para los antibióticos probados con las cepas de referencia. Como se puede observar el contenido del disco puede ser diferente al establecido para obtener un halo que se encuentre dentro del rango de halos especificados para E. coli ATCC 25922 y S. aureus ATCC 25923. Se supone que

esto se debe a que la actividad de los antibióticos que se usaron para establecer los diámetros de los halos, o bien que, la concentración indicada en la etiqueta de los antibióticos no correspondía a la concentración real de ellos. Es importante tener en mente el solvente primario de cada antibiótico para no incurrir en errores debido a la deficiente solubilidad de los mismos. Otro aspecto que se debe tener muy en cuenta es que la fórmula química del antibiótico debe tener acti-

vidad "in vitro" sin ningún proceso previo ya que algunas fórmulas de antibióticos necesitan ser hidrolizadas por el hígado para ejercer su actividad. En cuanto al aspecto de realidad, es de suma importancia la fabricación de discos en nuestro país. Un estudio de costos demostró que mil discos de ampicilina fabricados en el laboratorio tiene un valor ₡ 3,05, mientras que mil tabletas importadas cuestan ₡ 2500, para el cloranfenicol son de ₡ 4.00 los mil discos hechos el laboratorio contra ₡ 1.600 los importados, por último el costo ascendió a ₡ 3.85 para las tabletas de gentamicina hechas en el laboratorio y de ₡ 600 las tabletas importadas. Estos costos no incluyen el valor de las cajas de petri (donde son desechables) y los medios de cultivo usados en las pruebas. Sin embargo, el costo sigue siendo muy bajo comparado con el de las tabletas importadas.

RESUMEN

Se presenta la forma en que se preparan discos para pruebas de sensibilidad, con 3 antibióticos diferentes: Ampicilina, Gentamicina y Cloranfenicol. Los discos fueron probados utilizando las cepas de referencia *S. aureus* ATCC 25923, y *E. coli* ATCC 25922, para lograr los halos de inhibición establecidos para esos antibióticos con esas cepas control. Se hace referencia además de los costos de los discos para prueba de sensibilidad a los antibióticos fabricados en el laboratorio y se comparan con el valor de las tabletas importadas con la misma finalidad.

AGRADECIMIENTO

A la Dra. María de los Angeles San Román (Hospital San Juan de Dios) por facilitarnos la obtención del material para realizar el trabajo práctico. Al personal del Departamento de Bacteriología del Hospital San Juan de Dios por su excelente y eficaz colaboración.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Barry, A.L., Fay G.D. The amount of agar in antimicrobial disk susceptibility test plates. *American Journal of Clinical Pathology* 1973, 59(2): 196-198.
- 2.- Barry, A.L., L.J. Joyce, A.P. Adams, E.J. Benner. Rapid determination of antimicrobial susceptibility for urgent clinical situations. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1973, 59: 693-699.
- 3.- Bartlett, R.C., Mazens M. Analytical variability in the single disk antimicrobial susceptibility test. *American Journal of Clinical Pathology.*, 1973, 59 (3): 376-383.
- 4.- Bauer, A.W., Kirby W.M.M., Sherris J.C., M. Turck. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Technical Bulletin of the Registry of Medical Technologists.* 1966, 36 (3): 49-51.
- 5.- Bondi, A., Spaulding, E.H., Smith, D.E., Dietz, C.C. A routine method for the rapid determination of susceptibility to penicillin and other antibiotics. *Amer. J. M. Sci.*, 1947, 213: 221-225.
- 6.- Cutting Windsor. "Manual de Farmacología". Acción y uso de los medicamentos. Montaner y Simon S.A., Barcelona, España, 1964, II edición, pag. 13-69.
- 7.- Davis, V.W., and Stout T.R. Disc plate method of microbiological antibiotic assay. *Applied Microbiology*, 1971, 22 (4): 659-665.
- 8.- Ericsson, H.M. and J.C. Sherris. Antibiotic sensitivity testing. Report of an International Collaborative Study. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B. Suppl.*, 217.
- 9.- Federal Register. Rules and regulations, Antibiotic susceptibility discs. *Fed. Regist.*, 1972, 37: 21525-20529.
- 10.- Federal Register. Rules and regulations. Antibiotic susceptibility discs: correction. *Fed. Regist.*, 1973, 38, 2576.
- 11.- Jawetz, E.J.J., Melnich and E. Alderberg. Manual de Microbiología Médica. El Manual Moderno S.A., México, VII Edición, 1979: 118, 121-123, 346.
- 12.- Lennette, E.H., Balows A. Husler, J. Truant J. Manual of Clinical Microbiology. III Edition, Washington, D.C., Editorial Board, 1980, pag. 464-475.
- 13.- Mac Faddin Jean D. Biochemical test for

- identification of medical bacteria, Second Edition, Willams and Wilkins, U.S.A., 1980, pag. 482-483.
- 14.- Mac Farland, J. The nephelometer: An instrument for estimating the number of bacteria a in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *J. Am. Med. Assoc.* 1907, 49: 1176-1178 in *Applied Microbiology*, 1967, 15 (5): 1114-1121.
- 15.- National Committe for Clinical Laboratory Standars, 1979. Performance Standars for antimicrobial disc susceptibility test. Approved Standard, ASM-2, National Committee for Clinical Laboratory Standars, Villanova, P.A.
- 16.- *Rasegna Médica, Monografía 2. El mecanismo de acción de los antibióticos*, grupo Lepetit, Milán, No. 162, p 1-4.
- 17.- Revised Tentative Standard. Performance Standard for antimicrobial disc susceptibility test, as used in Clinical Latoratories. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Los Angeles, 1973.
- 18.- Shahidi, A. and P.D. Ellner. Effect of mixed cultures on an antibiotic susceptibility testing. *Appl. Microbiol.*, 1969, 18: 766-770.
- 19.- World Health Organization. Standarization of methods for conducting microbic sensitivity test. Second report of the expert Committee on antibiotics. World Health Organization. Tech. Rep. Serv. No. 210, p. 1-24.