

Halos de Inhibición

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD BACTERIANA

Las pruebas de sensibilidad bacteriana se llevan a cabo mediante el antibiograma que sirve para medir la sensibilidad de una cepa bacteriana a uno o varios antibióticos. El estudio de la sensibilidad *in vitro* es uno de los requisitos previos para la eficacia *in vivo* de un tratamiento antibiótico. También es importante para realizar estudios sobre la evolución de las resistencias bacterianas que permite revisar los protocolos de la antibioticoterapia empírica.

Conceptos:

La determinación de la Concentración Mínima Inhibidora (CMI) es la medida de la sensibilidad de una bacteria a un antibiótico. Es la mínima cantidad de antimicrobiano que es capaz de impedir el crecimiento de un microorganismo en unas condiciones normalizadas. Es el método habitual utilizado en los laboratorios de Microbiología Clínica. Para llevarlo a cabo es necesario utilizar cepas control (de referencia) con el fin de que los resultados sean reproducibles y comparables. Este método nos ofrece información sobre la sensibilidad de las bacterias S (sensible), I (intermedia) y R (resistente).

Sensible, si existe una buena probabilidad de éxito terapéutico en el caso de un tratamiento a la dosis habitual.

Resistente, si la probabilidad de éxito terapéutico es nula o muy reducida. No es de esperar ningún efecto terapéutico sea cual fuere el tipo de tratamiento.

Intermedia, cuando el éxito terapéutico es imprevisible. Se puede conseguir efecto terapéutico en ciertas condiciones (fuertes concentraciones locales o aumento de la posología).

Existen diferentes técnicas de laboratorio que permiten medir o calcular de forma rutinaria, y de manera semicuantitativa, las CIM (métodos manuales y métodos automatizados o semiautomatizados). Se puede realizar mediante:

- 1.- Difusión en agar: Disco placa y E test
- 2.- Dilución: Medio sólido y Medio líquido (micro/macrodilución)
- 3.- Mecanizados y Automatizados

La Concentración Mínima Bactericida (CMB) es la mínima cantidad de antibiótico capaz de destruir el 99,9% de una muestra inoculada en condiciones estandarizadas.

Métodos

En un primer momento, el método estándar utilizado para las pruebas *in vitro* fue el de dilución en caldo, que proporcionaba un resultado cuantitativo. Actualmente existen varios métodos que se utilizan para llevar a cabo los estudios de sensibilidad a los antibióticos y todos ellos se realizan bajo condiciones estandarizadas por organismos internacionales.

Dilución en caldo

Se colocan concentraciones decrecientes del agente antimicrobiano, generalmente diluciones 1:2, en tubos con un caldo de cultivo que mantiene el desarrollo del microorganismo. Los antibióticos se preparan en "soluciones madre" concentradas y luego se diluyen en caldo hasta obtener las concentraciones apropiadas.

Un tubo de caldo se mantiene sin inocular como control negativo de crecimiento. Después de un periodo de incubación adecuada se observa la turbidez de los tubos que indica el desarrollo bacteriano. El microorganismo crecerá en el tubo control y en todos los que no contengan suficiente antibiótico que sea capaz de inhibir su desarrollo. La concentración de antibiótico que presente ausencia de crecimiento es la Concentración Mínima Inhibitoria.

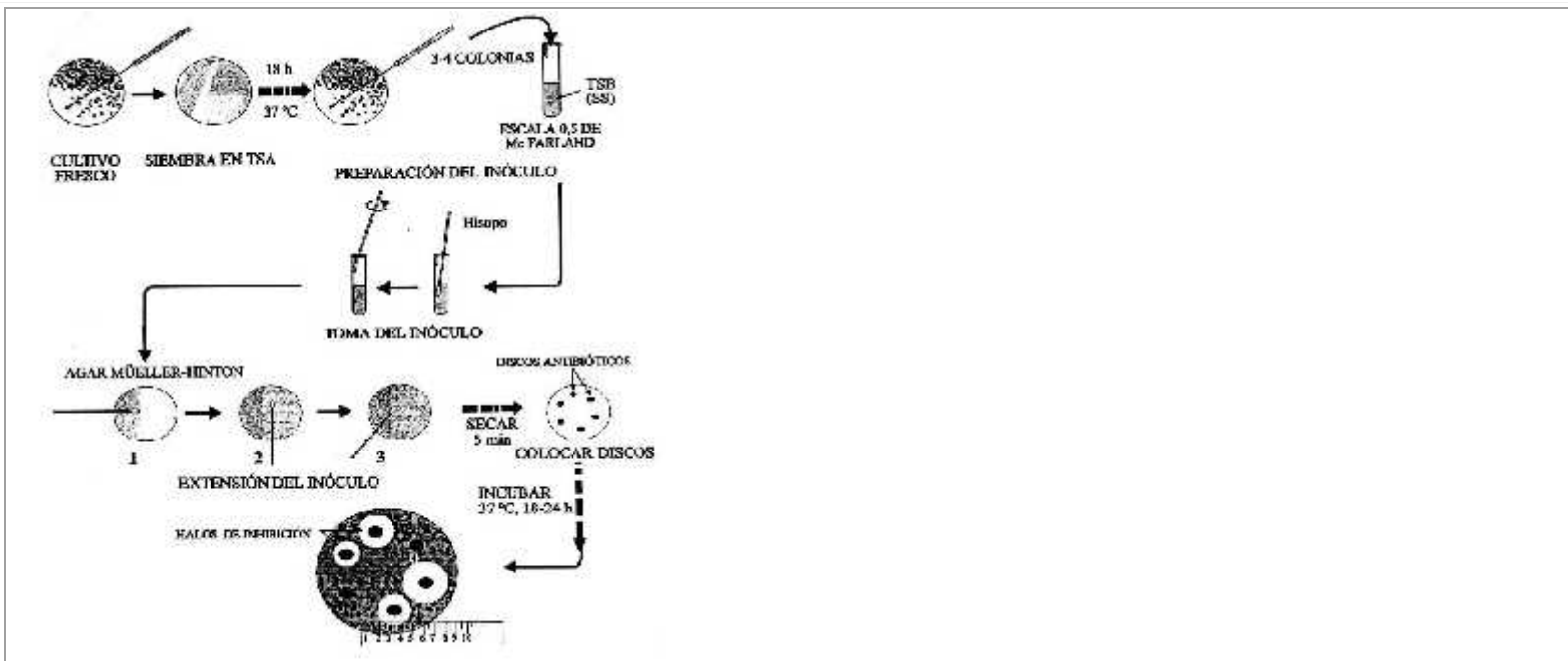
Para medir la CMB se debe realizar la prueba de actividad bactericida, que emplea el mismo sistema de dilución en caldo que para medir la sensibilidad.

A partir de la CMI, se siembra una cantidad conocida de inóculo de cada uno de los tubos de caldo que no tienen turbidez en placas de agar, y el número de colonias que crece en estos subcultivos, después de incubar durante la noche, se compara con el número de UFC/ml del cultivo original. La mínima concentración del agente antibacteriano que permite sobrevivir a menos de 0,1 % del inóculo original se denomina concentración bactericida mínima (CBM).

Difusión en agar

Este método incorpora el antimicrobiano a discos de papel de filtro. Su introducción permitió agilizar la determinación de la sensibilidad de las cepas bacterianas frente a un número importante de antimicrobianos de forma simultánea. El empleo de los discos de papel de filtro para las pruebas de sensibilidad está estandarizado y se correlaciona con las CMI. Durante muchos años, y a pesar de ser una técnica puramente cualitativa, el método de difusión por disco (o método Kirby-Bauer), en función sobre todo de su comodidad, economía y fiabilidad, ha sido uno de los más utilizados en los laboratorios.

El microorganismo a investigar se inocula en una o varias placas de agar y sobre su superficie se disponen los discos correspondientes a varios antibióticos. Se incuban las placas durante 16-24 horas y se estudia el crecimiento en ellas. Se valora el diámetro de la zona de inhibición que se forma alrededor de cada disco y se compara con las referencias oportunas publicadas por la NCCLS. De esta manera se sabe si el microorganismo es Sensible, Intermedio o Resistente a cada uno de los antibióticos.



Método de E-test

Es un método más reciente, es una combinación de características de los métodos anteriores. Se trata de una técnica cuantitativa en placa que permite obtener una lectura directa de CMI en $\mu\text{g/ml}$, ya que se emplean tiras plásticas impregnadas en concentraciones crecientes de antibiótico.

El microorganismo se inocula en una placa y sobre ella se deposita la tira del antibiótico (o antibióticos) a ensayar. Se incuba durante 16-24 horas a 35°C y se valora la zona de inhibición alrededor de cada tira. La CMI se lee directamente observando el punto más bajo de la elipse que presente el crecimiento.

Métodos automatizados

La mayoría de estos métodos utilizan sistemas de microdilución en medio líquido sobre microplacas con pocillos en "U" e interpretan el crecimiento bacteriano en los diferentes pocillos por medio de un autoanalizador (mediciones por turbidez o fluorescencia). Anteriormente se hacía por lectura óptica del técnico a través de un espejo invertido.

Son sistemas fáciles y rápidos, generalmente automatizada o semiautomatizada. Son métodos ideales para grandes volúmenes de trabajo. Una de sus grandes limitaciones es que sólo ofrecen garantía para investigar microorganismos de crecimiento rápido y que no tengan requerimientos especiales.