

Pruebas de sensibilidad a los antibióticos por el método estandarizado de difusión en agar

Patrones de sensibilidad de bacilos gram-negativos, en relación a antibióticos tradicionales y nuevos aminoglicósidos, en el Hospital México.

DR. ADOLFO G. BAGNARELLO M. *
SR. RODRIGO BRENES**

RESUMEN

En un período comprendido entre octubre de 1976 y diciembre de 1976 se efectuaron pruebas de sensibilidad in vitro por el método estandarizado de difusión en agar de Kirby-Bauer. Se analizaron los patrones de sensibilidad a viejos y nuevos antibióticos para bacilos gram negativos aeróbicos y facultativos aislados de muestras clínicas.

Resistencia importante de *E. coli* ha emergido para ampicilina, y parece estar surgiendo rápidamente para trimetoprim-sulfametoxazole en relación a varios tipos de bacilos gram negativos. Cefalosporinas permanecen activas contra la mayoría de *Klebsiella*, *E. coli* y *Proteus sp.* Carbenicilina es activa contra un buen número de *E. coli*, *Proteus sp.*, *Enterobacter* y *Pseudomonas*. Aminoglicósidos conocidos como la gentamicina y nuevos como la sisomicina y tobramicina son activos contra la mayoría de los *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas*. Se recomienda la implementación de este método para el trabajo de rutina clínico, y un análisis estadístico periódico en cada ins-

titución asistencial acerca del patrón de sensibilidades, todo lo cual facilitaría una es-cogencia más racional y un uso más adecuado de los agentes antimicrobianos.

Introducción

Hemos creído conveniente analizar en forma prospectiva y de acuerdo a métodos estandarizados, la sensibilidad a los antibióticos de los organismos aeróbicos o facultativos gram negativos más frecuentemente encontrados en la clínica para determinar el patrón de sensibilidad y resistencia prevalente en nuestro medio. Hemos incluido productos como el trimetoprim sulfametoxazole que ha cobrado gran popularidad últimamente, y drogas nuevas como la sisomicina y tobramicina, que han sido introducidas recientemente al mercado.

Con este trabajo preliminar quisimos introducir el método estandarizado in vitro para pruebas de sensibilidad en el Hospital México, y recalcar la necesidad urgente de su implementación en el trabajo de rutina hospitalaria, lo cual permitirá un conocimiento más preciso del grado de resistencia o susceptibilidad a los antibióticos.

Método

Durante un período comprendido entre octubre y diciembre de 1976, se practicaron pruebas estandarizadas de sensibilidad in vitro a todos los microorganismos aeróbicos o facultativos gram negativos aislados de es-

* Asistente en Medicina Interna y Enfermedades Infecciosas, Hospital México.

* Instructor en Medicina Interna, Universidad de Costa Rica.

* Dirección actual, Servicio de Medicina Hospital San Rafael de Alajuela.

** Técnico de Bacteriología Laboratorio de Investigación Clínica, Hospital México.

pecímenes clínicos en el Laboratorio de Investigación Clínica del Hospital México. Las pruebas de sensibilidad por difusión in vitro fueron efectuados de acuerdo al método de Kirby - Bauer (1), con algunas modificaciones como recomendado actualmente por la Food and Drug Administration. U.S.A. (2) (3) (4). El medio de agar usado fue tripticase soy agar (Mueller-Hinton preferiblemente) y/o Wellcotest de Wellcome para pruebas de sensibilidad con trimetoprin-sulfametoxazole. Las placas de Petri así preparadas contienen una altura aproximada de 4 mm de agar y son almacenadas en refrigerador a 2°C - 8°C hasta el momento de su uso. El inóculo fue preparado usando 4-5 ml, de caldo nutritivo de tiogli-

colato (preferiblemente soybean casein digest broth), el cual es sembrado después de tocar 4-5 colonias del microorganismo. Los cultivos del caldo se incuban por 2-5 hrs. y se diluyen posteriormente para obtener una turbidez visualmente comparable a la solución standard de sulfato de bario (comparable al 50% de la densidad de la standard N° 1 de McFarland). Las placas se inoculan con un aplicador de algodón que ha sido impregnado con la dilución del caldo inoculado así preparado. A las placas inoculadas se les permite secar y luego 5 discos estandarizados se distribuyen en cada una de ellas. La lectura se efectúa a las 16-24 hrs. de incubación a 37°C de acuerdo al siguiente criterio:

Antibiótico	Disco	Diámetro zona inhibición (mm.)		
		Resist	Interm	Sensib.
Ampicilina	50 mcg	11	12 - 13	14
Carbencilina	50 mcg (E. Coli y Proteus sp.)	17	18 - 22	23
	100 mcg (E. Coli, Proteus sp., Pseudomonas)	17	18 - 22	23
		13	14 - 16	17
Cefalotina	30 mcg	14		15
Gentamicina	10 mcg	12		13
Tobramicina	10 mcg	11	12 - 13	14
Sisomicina	10 mcg	14		14
Trimetoprin	1.25 mcg/	10	11 - 15	16
Sulfametoxazole	23.75 mcg			

Identificación de los microorganismos se efectuó por técnicas standard incluyendo morfología macroscópica de la colonia en agar sangre y McConkey, triple-azúcar-hierro, urea, citrato de Simmons, medio de Simmons para motilidad y producción de indol.

Resultados

A. Microorganismos

Escherichia coli permanece sensible en la mayoría de los casos a cefalosporinas, ampicilina, trimetoprin-sulfametoxazole, gen-

tamicina, carbencilina, sisomicina y tobramicina. Importante resistencia ha emergido para ampicilina, y empieza a emerger para trimetoprin- sulfametoxazole. (Tabla 1).

Klebsiella sp permanece sensible en la mayoría de los casos a cefalotina, gentamicina, sisomicina y tobramicina (Tabla II).

Resistencia a trimetoprí- sulfametoxazole parece ser también significativa (5/32 casos). Alta resistencia para ampicilina y carbenicilina ocurrió.

Enterobacter sp parece ser bastante sensible a gentamicina, carbenicilina, tobramicina y sisomicina (Tabla III). Aunque el total de casos fue pequeño, resistencia a trimetoprí- sulfametoxazole parece ser significativa (3/7 casos).

Proteus sp., especialmente Proteus mirabilis permanece sensible a la mayoría de los antibióticos usados (Tabla IV). Pseudomonas sp es aún altamente sensible a gentamicina, y otros aminoglicósidos como sisomicina y tobramicina. (Tabla V). Carbenicilina fue menos efectiva.

TABLA I. Sensibilidad de E. Coli a diferentes antibióticos.

Antibiótico	Sensibilidad	Nº de casos
Cefalotina	Sensible	11/15
	Intermedio	2/15
	Resistente	2/15
Ampicilina	Sensible	18/29
	Intermedio	1/29
	Resistente	10/29
TMT-SMX*	Sensible	26/32
	Intermedio	
	Resistente	6/32
Gentamicina	Sensible	32/34
	Intermedio	1/34
	Resistente	1/34
Carbenicilina	Sensible	20/33
	Intermedio	12/33
	Resistente	1/33
Sisomicina	Sensible	20/21
	Intermedio	0/21
	Resistente	1/21
Tobramicina	Sensible	17/17
	Intermedio	0/17
	Resistente	0/17

TABLA II. Sensibilidad de Klebsiella sp a varios antibióticos,

Antibiótico	Sensibilidad	Nº de casos
Cefalotina	Sensible	13/16
	Intermedio	1/16
	Resistente	2/16
Ampicilina	Sensible	13/25
	Intermedio	2/25
	Resistente	10/25
Trimetoprí- sulfametoxazole	Sensible	27/32
	Intermedio	5/32
Gentamicina	Resistente	32/34
	Sensible	1/34
	Intermedio	1/34
Carbenicilina	Sensible	13/31
	Intermedio	6/31
	Resistente	12/31
Sisomicina	Sensible	15/17
	Resistente	1/17
Tobramicina	Sensible	12/15
		2/15
		1/15

TABLA III. Sensibilidad de Enterobacter a diferentes antibióticos.

Antibiótico	Sensibilidad	Nº de casos
Cefalotina	Sensible	1/2
	Resistente	1/2
Ampicilina	Sensible	4/6
	Intermedio	1/6
	Resistente	1/6
TMT-SMX*	Sensible	3/7
	Intermedio	1/7
	Sensible	3/7
Sisomicina	Sensible	6/6
Tobramicina	Sensible	5/5
Carbenicilina	Sensible	5/7
	Intermedio	1/7
	Resistente	1/7
Gentamicina		7/7

* Trimetoprí- sulfametoxazole.

B. *Antibióticos* (Tablas VI y VII).

Cefalotina mostró actividad contra la mayoría de *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Proteus mirabilis*.

Ampicilina fue activa contra *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis*. Sin embargo, un importante porcentaje de *Escherichia coli* (10/29 casos) presentaron resistencia al antibiótico.

Trimetoprin-sulfametoxazole fue efectivo en general contra *Klebsiella sp.*, *Escherichia coli*, *Enterobacter sp.*, y *Proteus sp.* Sin embargo importante resistencia a los tres primeros antimicrobianos fue apreciada.

Gentamicina es aún activa contra más del 90% de los microorganismos investigados.

Carbenicilina fue eficaz contra un buen número de *E. coli*, *Enterobacter sp.*, *Proteus mirabilis* y *Pseudomonas sp.* *Klebsiella* fue usualmente resistente.

Tobramicina mostró actividad contra la mayoría de los bacilos gram negativo que se examinaron, incluyendo 12/12 casos de *Pseudomonas sp.*

Sisomicina se comportó en forma parecida a Tobramicina, incluyendo actividad definida contra 11/11 casos de *Pseudomonas sp.*

TABLA IV. Sensibilidad de *Proteus sp* a varios antibióticos.

Antibiótico	Sensibilidad	Nº de casos
Cefalotina	Sensible	6/7
	Resistente	1/7
Ampicilina	Sensible	2/10
	Resistente	
TMT-SMX	Sensible	9/10
	Resistente	
Gentamicina	Sensible	10/10
Carbenicilina	Sensible	8/9
	Resistente	1/9
Tobramicina	Sensible	2/2
Sisomicina	Sensible	2/2

TABLA V. Sensibilidad de *Pseudomonas sp* para varios antibióticos.

Antibiótico	Sensibilidad	Nº de casos
Gentamicina	Sensible	13/13
Carbenicilina	Sensible	10/13
	Intermedio	1/13
	Resistente	2/13
Sisomicina	Sensible	11/11
Tobramicina	Sensible	12/12

Discusión

Los resultados de sensibilidad in vitro a los antibióticos depende de muchas variables y la necesidad de estandarización del método ha sido demostrado ampliamente por Kirby y Bauer (1). Esta necesidad indispensable de estandarización del método de difusión en agar para la correcta interpretación de la sensibilidad de un microorganismo ha sido una de nuestras inquietudes en el Hospital México. Este reporte preliminar se efectúa con el objeto de implementar el método en nuestro medio y de analizar a la luz de estos resultados iniciales las tendencias de sensibilidad a los antibióticos imperantes en el Hospital México. Asimismo hemos agregado varios nuevos agentes como la sisomicina, tobramicina y trimetoprin-sulfametoxazole a la batería de sensibilidad para determinar el patrón de resistencia temprana a estos nuevos antimicrobianos.

El análisis sistemático de la flora bacteriana patógena y sensibilidad a los antibióticos imperante en cada centro de salud es importante en varios aspectos prácticos como escogencia de antibióticos en situaciones de emergencia basados en el patrón de sensibilidad local, detección de desarrollo acelerado de resistencia a determinados antimicrobianos y aparición de microorganismos altamente resistentes que pueden provocar graves infecciones nosocómicas. Como estos patrones de población bacteriana y resistencia a antibióticos puede variar de institución a institución dependiendo fundamentalmente del uso correcto o abuso de los antibióticos es fundamental que cada centro asistencial efectúe sus análisis estadísticos por separado en forma periódica.

TABLA VI. Actividad de varios antibióticos in vitro.

Antibiótico	Microorganismo	Sensibilidad y N° de casos		
Cefalotina	Klebsiella	(s) 13/16	(i) 1/16	(r) 2/16
	E. coli	(s) 11/15	(i) 2/15	(r) 2/15
	Enterobacter	(s) 1/2		(r) 1/2
	Proteus	(s) 6/7		(r) 1/7
Ampicilina	Klebsiella	(s) 13/25	(i) 2/25	(r) 10/25
	E. coli	(s) 18/29	(i) 1/29	(r) 10/29
	Enterobacter	(s) 4/6	(i) 1/6	(r) 1/6
	Proteus	(s) 8/10	(i)	(r) 1/7
TMT-SMX*	Klebsiella	(s) 27/32	(i)	(r) 5/32
	E. coli	(s) 26/32	(i)	(r) 6/32
	Enterobacter	(s) 3/7	(i) 1/7	(r) 3/7
	Proteus	(s) 9/10	(i)	(r) 1/10
Carbenicilina	Klebsiella	(s) 13/31	(i) 6/31	(r) 12/31
	E. coli	(s) 20/33	(i)	(r)
	Enterobacter	(s) 5/7	(i) 1/17	(r) 1/7
	Proteus	(s) 8/9	(i)	(r) 1/9
	Pseudomonas	(s) 13/13	(i) 2/13	(r) 1/13

(s) = Sensible (i) = Intermedio (r) = Resistente

TABLA VII. Actividad de varios aminoglicósidos in vitro.

Antibiótico	Microorganismo	Sensibilidad y N° de casos		
Gentamicina	Klebsiella	(s) 32/34	(i) 1/34	(r) 1/34
	Enterobacter	(s) 7/7		
	E. coli	(s) 32/34	(i) 1/34	(r) 1/34
	Proteus	(s) 10/10		
	Pseudomonas	(s) 13/13		
Tobramicina	Klebsiella	(s) 17/17		
	Enterobacter	(s) 12/15	(i) 2/15	(r) 1/15
	E. coli	(s) 5/5		
	Proteus	(s) 2/2		
	Pseudomonas	(s) 12/12		
Sisomicina	Klebsiella	(s) 20/21	(i) 1/17	
	Enterobacter	(s) 15/17	(i) 1/17	(r) 1/17
	E. coli	(s) 6/6		
	Proteus	(s) 2/2		
	Pseudomonas	(s) 11/11		

* TMT-SMX = trimetoprim sulfametoxazole

(s) = sensible (i) = Intermedio (r) = Resistente

En nuestro hospital, la *E. coli* permanece sensible a la mayoría de antibióticos investigados pero resistencia significativa a ampicilina y trimetoprin - sulfametoxazole empieza a vislumbrarse. *Klebsiella* sp permanece bastante sensible a las cefalosporinas, y por tanto el uso excesivo de gentamicina para infecciones menores causadas por este organismo no parece estar justificada. *Enterobacter* sp es usualmente sensible a carbenicilina y gentamicina en nuestro medio. El organismo es usualmente resistente a ampicilina, cefalosporinas, y en nuestro hospital la resistencia a trimetoprin- sulfametoxazole parece ser significativa. *Proteus mirabilis* es sensible a ampicilina y cefalosporinas. *Proteus* indol-positivo usualmente requiere aminoglicósidos, aunque en orina, trimetoprin-sulfametoxazole parece ser efectivo en nuestro medio. *Pseudomonas* sp es sensible a gentamicina, carbenicilina y los nuevos aminoglicósidos tobramicina y sisomicina.

Ampicilina permanece como un buen antibiótico en nuestro medio contra *E. coli* y *Proteus mirabilis* pero importante resistencia ha emergido. En algunos hospitales más del 50% de *E. coli* son resistentes a la ampicilina (5). *Enterobacter*, *Klebsiella* sp, *Serratia*, *Citrobacter*, *Hafnia*, *Edwardsiella*, *Arizona* y *Providencia* son casi siempre ampicilina-resistentes. (6) (7).

Cefalosporinas son activas contra *E. coli*, *Proteus mirabilis* y la mayoría de *Klebsiella* sp en nuestro medio. El *Proteus* indol-positivo, *Enterobacter*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter* sp, *Providencia*, *Hafnia*, *Edwardsiella* y *Arizona* sp, son usualmente cefalosporina-resistentes (8). Trimetoprin-sulfametoxazole, un promotor quimioterápico para infecciones urinarias producidas por una gran variedad de bacilos gram negativos, incluyendo organismos sulfa-resistentes (9) (10), empieza a mostrar temprano desarrollo de ineffectividad a varios miembros de la familia *Enterobacteriaceae* en nuestro medio. Gentamicina aún es activo contra más del 90% de los microorganismos gram-negativos investigados, incluyendo *Pseudomonas*, en nuestro medio. Experiencias similares han sido reportadas por otros (11). Sin embargo, en ciertos hospitales, 14% de *Proteus morgani* y 41% de *Providencia* sp son gentamicina-resistentes (12).

Pseudomonas aeruginosa es aún muy sensible a la gentamicina en nuestro hospital, aunque creciente resistencia ha sido reportada en otros países desde 1971, especialmen-

te en hospitales dedicados a pacientes con cáncer (13).

Carbenicilina fue eficaz contra un buen número de *E. coli*, *Enterobacter* sp, *Proteus mirabilis* y *Pseudomonas* sp. *Klebsiella* fue usualmente resistente. Creciente resistencia contra este antibiótico ha sido reportado desde 1966 (14), incluyendo desarrollo acelerado de resistencia después de pocos días de iniciado el tratamiento, por lo cual la droga debe de usarse en forma restringida y/o asociada a un aminoglicósido.

Tobramicina, un nuevo aminoglicósido, mostró actividad contra la mayoría de los bacilos gram negativos que se examinaron incluyendo 12/12 casos de *Pseudomonas* sp. Esta amplia actividad contra todos los *Enterobacteriaceae* (15), aunado al hecho que tobramicina es dos a cuatro veces más activa contra *Pseudomonas aeruginosa* que gentamicina (16), hacen de tobramicina una adición prometedor al armamentario terapéutico. Tobramicina puede ser activa también contra *Pseudomonas aeruginosa* resistente a la gentamicina (17).

Sisomicina se comportó en forma parecida a tobramicina, incluyendo actividad definida contra 11/11 casos de *Pseudomonas* sp. Este nuevo aminoglicósido es también muy similar a gentamicina pero es ligeramente más activo contra varios bacilos gram negativos (18). Experimentos en animales sugieren que sisomicina puede ser el aminoglicósido más activo cuando investigado *in vivo* (19). Sin embargo bacilos gram negativos resistentes a gentamicina, son usualmente sisomicina-resistentes (20).

BIBLIOGRAFIA

- 1.—BAUER AW., KIRBY WMM., SHERRIS JC., TURCK M.: Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J. Clin Pathol* 45: 493, 1966.
2. FEDERAL REGISTER. Rules and Regulation. Antibiotic susceptibility discs. *Fed. Regist.* 37: 20525, 1972.
- 3.—FEDERAL REGISTER. Rules and Regulations. Antibiotic susceptibility discs. *Fed. Regist.* 38: 2576, 1973.
- 4.—LENNETTE EH, SPAULDING EH, TRUANT JP. *Manual of Clinical Microbiology*. Second Edition. American Society for Microbiology.
- 5.—NYSTRÖM, B. Patterns of antibiotic sensitivity in bacteria isolated from hospital in-patients. *Scand J. Infect Dis* 3: 229, 1971.

- 6.—EICKHOFF JC., STEINHAEUER BW., FINLAND M.
The Klebsiella - Enterobacter - Serratia division. Biochemical and serological characteristics and susceptibility to antibiotics. *Ann Intern Med.* 65: 1163, 1966.
- 7.—BEAR DM, TURCK M., PETERSDORF RG.
Ampicillin. *Med. Clin North America.* 54: 1145, 1970.
- 8.—WATERWORTH PM.
The susceptibility of pathogenic gram negative bacilli to cephalosporins. *Postgraduate Med. J. (Suppl)* 47: 25, 1971.
- 9.—HARDING GKM, RONALD AR.
Efficacy of trimethoprim-sulfamethoxazole in bacteriuria. *J. Infect Dis (Suppl)* 128: 641, 1973.
- 10.—STRATFORD BC, DIXSON S.
Results of treatment with trimethoprim plus sulphamethoxazole. *Med. J. Aust.* 1: 526, 1971.
- 11.—WAITZ JA., WEINSTEIN MJ.
Recent microbiological studies with gentamicin. *J. Infect Dis* 119: 355, 1969.
- 12.—ROE E., LOWBURY EJJ.
Changes in antibiotic sensitivity patterns of gram-negative bacilli in burns. *J. Clin Path* 25: 176, 1972.
- 13.—GREENE WH., MOODY M., SCHIMPF S., YOUNG VM., WIERNICK PH.
Pseudomonas aeruginosa resistant to carbenicillin and gentamicin. *Ann Intern Med.* 79: 684, 1973.
- 14.—JONES RJ., LOWBURY EJJ.
Prophylaxis and therapy for *Pseudomonas aeruginosa* infection with carbenicillin and gentamicin. *Brut Med. J.* 3: 78, 1967.
- 15.—WATERWORTH PM.
The in-vitro activity of tobramycin compared with that other aminoglycosides. *J. Clin Path* 25: 979, 1972.
- 16.—WRETLIND B., NORD CE., WADSTRÖM J.
In vitro sensitivity of isolates of *Pseudomonas aeruginosa* to carbenicillin, gentamicin, tobramycin and some other antibiotics. *Scand J. Infect Dis* 6: 49, 1974.
- 17.—LOCKWOOD WR., LAWSON LA.
Studies on the susceptibility of 150 consecutive clinical isolated of *Pseudomonas aeruginosa* to tobramycin, gentamicin, colistin, carbenicillin and five other antimicrobials. *Antimicrob Ag Chemother* 4: 281, 1973.
- 18.—HYMAS PJ., SIMBERKOFF MS., RAHAL JJJR.
In vitro bactericidal effectiveness of four aminoglycoside antibiotics. *Antimicrob Ag. Chemother* 3:87, 1973.
- 19.—WAITZ JA., MOSS EL JR.
Drube CG., Weinstein MJ. Comparative activity of sisomicin, gentamicin, kanamycin and tobramycin. *Antimicrob Ag Chemother* 2: 431, 1972.
- 20.—YOUNG LS., HEWITT WL.
Activity of five aminoglycoside antibiotics against gram-negative and staphylococcus aureus. *Antimicrob Ag Chemother* 4: 617, 1973.