

Prueba rápida de sensibilidad a antibióticos*

I. Comparación con el método usual lento

DRA. VIRGINIA UMAÑA **

DR. BERNAL FERNÁNDEZ***

Antes de que se comenzaran a usar los antibióticos como arma terapéutica para el control de las enfermedades infecciosas del hombre y de los animales, ya existían diferencias en la susceptibilidad natural de los diversos microorganismos frente a los antibióticos que hoy conocemos. El uso indiscriminado de estas drogas ha contribuido a la eliminación de las cepas sensibles y a su sustitución por cepas resistentes. La selección de la droga apropiada se hace aún más difícil para el médico que ha de instituir el tratamiento, si consideramos el crecido número de antibióticos a su disposición.

Con frecuencia hay necesidad de establecer el tratamiento antes de conocer el resultado del antibiograma. Para brindar al clínico mejor base en el empleo de una antibiótico-terapia racional, varios investigadores (4, 9, 10) han emprendido la búsqueda de técnicas que permitan obtener resultados en un tiempo menor que el usual (uno o más días).

Desafortunadamente, los inconvenientes de los métodos propuestos han anulado la ventaja de su rapidez. Promisoria excepción constituye el procedimiento de Jackson *et al.* (6), evaluado y modificado por Bass *et al.* (1, 2), el cual se basa en la reducción de la hemoglobina de la sangre (incorporada al medio de cultivo) como consecuencia de la actividad respiratoria de las bacterias.

El presente trabajo tiene por objeto modificar el método original de Jackson para hacerlo más sencillo y a la vez poder obtener lecturas más nítidas que las que permiten las técnicas de los autores antes citados, sin disminuir el grado de confianza en los resultados.

MATERIAL Y METODOS

Sangre. Se empleó sangre humana citratada procedente de las existencias vencidas (1 a 3 meses después de recolectada) de los bancos de sangre.

* Este trabajo es parte de la tesis presentada por el autor principal para completar los requisitos para optar al título de Licenciada en Microbiología y Química Clínica en La Universidad de Costa Rica y fue realizado en el Departamento de Microbiología de dicha Universidad.

** Dirección actual: Universidad de Duke, Durham, N. C., U.S.A.

*** Departamento de Microbiología, Universidad de C. R.

Antibióticos. En todas las pruebas se emplearon discos de papel impregnados con antibióticos*, así: clortetraciclina (aureomicina), 5 y 30 μg ; cloranfenicol, 5 y 30 μg ; eritromicina, 2 y 15 μg ; penicilina, 2 y 10 unidades; oxitetraciclina (terramicina), 5 y 30 μg ; y dihidroestreptomina, 2 y 10 μg .

Bacterias. Se utilizaron 116 cultivos puros, aislados de diversos casos clínicos, distribuidos así: 62 de *Staphylococcus aureus*, 25 de *Escherichia coli*, 14 de *Pseudomonas* sp., 5 de *Streptococcus pyogenes*, 4 de *Klebsiella* sp., 3 de *Proteus* sp., 2 de *Corynebacterium diphtheriae* y 1 de *Salmonella* grupo B. También se usó material procedente de 6 abscesos cerrados, de 9 orinas cateterizadas y de 5 infecciones expuestas (2 de otitis, 1 de abscesos múltiples y 2 de úlceras en las piernas).

Medios de cultivo. Los siguientes fueron empleados: Caldo con Soya y Trypticase (BBL-01-162), Infusión de Cerebro y Corazón (Difco B-37) Agar con Soya y Trypticase (BBL-01-168) y Agar-agar (Difco B-140).

Método usual lento. En cada plato de petri se deposita un volumen de 20 ml. de Agar con Soya y Trypticase, con 5% de sangre. Los platos se rayan con torunda empapada en el inóculo y, una vez desaparecido el exceso de humedad, se colocan los discos con antibiótico y se incuban los platos por 24 horas a 37°C, procediéndose luego a su lectura.

Método rápido según nuestra modificación. El medio terminado consta de dos partes, a saber: una capa inferior, que sirve de reservorio de nutrimento y una capa superior, semisólida, en la que se incluye el inóculo.

Capa inferior. Al Caldo con Soya y Trypticase (o a la Infusión de Cerebro y Corazón) se agrega 1.5% de Agar-agar, se envasa en volúmenes de 10 ml. en tubos con tapa de rosca (o con taponés de algodón con cubiertas de papel de aluminio para retardar la evaporación durante su almacenamiento) y se autoclava a 121°C por 15 minutos.

El medio se puede guardar refrigerado en esta forma durante varios meses sin que sufra deterioro. Para emplearse, se licúa el medio en agua hirviendo y se deja enfriar a 50°C; luego se vacía en un plato de petri estéril, en el que previamente se han depositado 2 ml. de sangre citratada, se mezcla con la sangre mediante movimiento de rotación y se deja solidificar.

Capa superior. Se mezcla una porción del medio empleado para la *capa inferior* con igual volumen de Caldo con Soya y Trypticase (o Infusión de Cerebro y Corazón), obteniéndose así un medio cuya concentración de agar es de 0.75%. Este medio se distribuye y esteriliza en igual forma que el medio para la *capa inferior*, pero en volúmenes de 4 ml. Para emplearse, se licúa y se deja enfriar a 50°C, y se inocula con 1 ml. de una suspensión de bacterias (hecha levantando una o más colonias aisladas y dispersándolas en un pequeño volumen de caldo, de suerte que apenas muestre turbiedad). Se mezcla el contenido del tubo y se vierte inmediatamente sobre la *capa inferior* contenida en el plato de petri, de manera tal que cubra toda su superficie. Si se tratare de pus o de líquido ascítico, también se usa 1 ml. del material clínico para inocular el tubo de agar al 0.75% y se procede en la forma ya descrita.

Una vez solidificada la *capa superior*, se colocan sobre ella los discos de papel impregnados con los antibióticos y se incuban los platos en la forma usual.

* Fabricados por la Casa Oxoid Ltd. de Londres bajo el nombre de "Multidisk" y obtenidos a través de Consolidated Laboratories, Inc., Chicago Heights, Illinois, U.S.A.

Lectura de resultados. La observación de los platos se realiza cada hora, desde la tercera hasta la sexta hora de incubación. La lectura de los resultados se hace dentro de ese plazo, tan pronto como se ponga de manifiesto el contraste entre el color rojo vivo de la hemoglobina oxigenada, en las zonas de inhibición alrededor de los discos, con el color rojo oscuro que toma la hemoglobina reducida en el resto del área en que la actividad metabólica de las bacterias no ha sido detenida. Esta lectura es definitiva para la mayoría de los casos; sin embargo, debe ser confirmada por una segunda lectura al completar las 24 horas de incubación, ya que ocasionalmente aparecen colonias resistentes en el área de inhibición después de una incubación más prolongada.

RESULTADOS Y DISCUSION

Nuestra modificación al método rápido de Jackson *et al.* para determinar la sensibilidad de bacterias a antibióticos fue comparada con la de Bass *et al.* (1, 2) y con el método usual lento desarrollado por varios autores, (3, 8, 11). Para mayor sencillez de presentación, nos limitaremos a confrontar nuestro método rápido con el método lento tradicional, el que empleamos como patrón. El lector interesado podrá ver en una publicación posterior (11) la comparación de nuestro método con el de Bass *et al.* ya citado.

Con las primeras 50 cepas bacterianas aisladas en cultivo puro a partir de casos clínicos se procedió a probar nuestra modificación a base del Medio de Soya y Trypticase. Habiendo utilizado 6 antibióticos a 2 concentraciones cada uno, obtuvimos 600 resultados o pruebas por cada método. En el Cuadro 1 podemos observar que en la lectura temprana, efectuada luego de 3 a 6 horas de incubación, 530 de las 600 pruebas obtenidas por el método rápido resultaron ser idénticas a las logradas luego por el método lento (a las 24 horas de incubación), dándonos un grado de concordancia del 88%. Cuando se hizo una segunda lectura del mismo material por el método rápido a las 24 horas de incubación, se encontró que el número de resultados concordantes entre ambos métodos se había elevado a 581 en el total de 600 pruebas o sea el 97%.

Posteriormente ensayamos nuestra técnica sustituyendo el Medio de Soya y Trypticase por el de Infusión de Cerebro y Corazón, empleando las otras 66 cepas de bacterias procedentes de casos clínicos. Los resultados de estas pruebas (Cuadro 2) fueron 792, obteniéndose una concordancia del 85% en las lecturas tempranas y del 91% en las segundas lecturas del método rápido efectuadas a las 24 horas. Hacemos notar que se logra una mejor correlación de los resultados obtenidos por nuestra técnica, en relación al método lento, empleando el Medio de Soya y Trypticase en vez del Medio de Infusión de Cerebro y Corazón.

Siendo que comparamos el método rápido con el método lento, se pueden presentar dos tipos de discrepancia en los resultados: uno, en el que un antibiótico produce zona de inhibición del crecimiento alrededor del disco en el método lento pero *no* en el método rápido (L+ R—); y otro en el que no hay zona de inhibición por el método lento, pero *sí* la hay por el rápido (L— R+). En el Cuadro 3 presentamos un detalle de la naturaleza de los resultados discrepantes obtenidos en los experimentos con el Medio de Soya y Trypticase (ver Cuadro 1).

Si examinamos el Cuadro 3, salta a la vista que el tipo predominante de discrepancia fue aquel en el cual un antibiótico *no* produjo inhibición por el método usual lento y *sí* la produjo por el método rápido (L— R+). Sin em-

bargo, es aparente también que el número de discrepancias de este tipo es mucho menor cuando se comparan las lecturas de ambos métodos correspondientes a las 24 horas. Este aumento en la correlación entre ambos métodos se debe, en muchos casos, a que la lectura temprana efectuada con el método rápido presentó zona de inhibición alrededor del disco; pero, al hacer la segunda lectura al día siguiente, se encontró que dentro de dicha zona habían emergido pequeñas colonias de variantes resistentes, obligando a cambiar la interpretación de "sensible" a "resistente".

Conocido es también el hecho de que algunos antibióticos como la aureomicina, tetraciclina, cloranfenicol, cephalothin y otros (7, 13), en solución acuosa, se destruyen a mayor o menor grado en tiempo relativamente corto. Igualmente interesante resulta la observación (5) de que el agar puede interferir en la actividad de antibióticos como las tetraciclinas, polimixina, estreptomina y otros. Esto puede explicar algunos casos en que la bacteria se mostró sensible a un antibiótico en la lectura temprana del método rápido, pero al hacer la segunda lectura a las 24 horas, había desaparecido la zona de inhibición y se manifestaba como resistente por ambos métodos.

Cuando se usó material clínico para inocular directamente, fue posible obtener resultados tempranos en 15 de los 20 casos (75%); en los otros 5, la cantidad de bacterias presente en la muestra clínica fue insuficiente para reducir la hemoglobina dentro de las primeras 6 horas. De estos 5 casos, 2 pudieron leerse al día siguiente por ambos métodos y 3 tenían un número inicial de bacterias tan bajo que no fue posible obtener resultados por uno u otro método. Hubo concordancia en 167 de los 180 resultados obtenidos con material clínico (93%); las discrepancias observadas fueron del tipo L— R+.

En base a los resultados obtenidos en el estudio de nuestra modificación al método rápido de Jackson *et al.* juzgamos que ella resultaría valiosa en la práctica clínica, especialmente en aquellos casos en que el médico considere que es necesario iniciar el tratamiento con antibióticos con la menor dilación. El médico podría contar con el resultado temprano del antibiograma en el curso del día y guiar así su tratamiento en forma mucho más específica. El laboratorio, al día siguiente, vendría a ratificar la información dada en base a la segunda lectura de resultados.

Por otra parte, siendo que algunos antibióticos han de administrarse a intervalos de 4 a 8 horas debido, entre otras razones, a la inactivación que sufren *in vivo*, los resultados tempranos dados por el método rápido pueden brindar una estimación más exacta de la actividad antibacteriana de que es capaz la droga en cuestión.

R E S U M E N

Se presenta una modificación a la técnica rápida de sensibilidad a antibióticos por reducción de hemoglobina, la que se evalúa confrontando sus resultados con los obtenidos mediante el método usual lento. Se recomienda el uso del Medio de Soya y Tripticase en la técnica rápida, por dar mejor concordancia con los resultados del método lento.

En el 75% de los casos en que se empleó material clínico y en todos los casos en que se usaron bacterias en cultivo puro, suspendidas en caldo, se pudieron leer los antibiogramas dentro de 3 a 6 horas de incubación. Estas pruebas concordaron con las obtenidas por el método lento en un 88% de los resultados. Una segunda lectura efectuada a las 24 horas elevó a 97% el grado de concordancia entre ambos métodos. Esto sugiere que el médico podría contar en el término de unas cuantas horas con una buena guía para la elección de un tratamiento específico; al efectuar la lectura de las 24 horas, el laboratorio puede ratificar los resultados tempranos.

CUADRO N° 1

CONCORDANCIA DE RESULTADOS ENTRE LOS METODOS USUAL LENTO Y RAPIDO MODIFICADO, EMPLEANDO MEDIO DE SOYA Y TRIPTICASE*

Incubación	Total de resultados** Método lento	Número resultados concordantes	Porcentaje resultados concordantes
3-6 horas	600	530	88
24 horas	600	581	97

* Se usaron 50 cepas bacterianas y 6 antibióticos a 2 concentraciones cada uno.

** Total de resultados por cada método = 50 cepas x 6 antibióticos x 2 concentraciones de cada antibiótico.

CUADRO N° 2

CONCORDANCIA DE RESULTADOS ENTRE LOS METODOS USUAL LENTO Y RAPIDO MODIFICADO, USANDO MEDIO DE INFUSION CEREBRO Y CORAZON*

Incubación	Total de resultados** Método lento	Número resultados concordantes	Porcentaje resultados concordantes
3-6 horas	792	676	85
24 horas	792	721	91

* Se emplearon 66 cepas bacterianas y 6 antibióticos a 2 concentraciones cada uno.

** Total de resultados por cada método = 66 cepas x 6 antibióticos x 2 concentraciones de cada antibiótico.

CUADRO N° 3

TIPO Y FRECUENCIA DE DISCREPANCIA ENTRE EL METODO USUAL LENTO Y EL METODO RAPIDO MODIFICADO, SEGUN EL ANTIBIOTICO Y EL PLAZO DE LECTURA*

Antibiótico	L+ R—**		L— R+	
	INCUBACION:		INCUBACION:	
	3-6 hrs.	24 hrs.	3-6 hrs.	24 hrs.
Aureomicina.....	0***	1	15	10
Terramicina.....	0	0	11	3
Eritromicina.....	0	1	12	0
Penicilina.....	0	1	5	1
Cloranfenicol.....	0	1	12	1
Estreptomicina.....	0	0	15	0

* Se usaron 50 cepas bacterianas y dos concentraciones de cada uno de los antibióticos. Experimento presentado en Cuadro 1.

** L+ R— = discrepancias debidas a que prueba lenta fue "sensible" mientras que la rápida fue "resistente". L— R+ = prueba lenta "resistente" y prueba rápida "sensible".

*** Las cifras indican la cantidad de discrepancias observadas en 100 pruebas.

SUMMARY

A modification of a rapid (hemoglobin reduction) method for antibiotic susceptibility testing is described and its results are compared with those obtained using the standard disc method. Trypticase Soy medium is recommended for use with this modification since it gives results which agree better with those of the standard disc technique.

In 75% of the cases in which clinical specimens were used and in all those in which broth suspensions of bacteria in pure culture were employed, the results of antibiotic susceptibility determinations could be read within 3 to 6 hours. The results of this rapid method correlated with those of the standard method to the extent of 88%. When a second reading was made at the end of 24 hours, the degree of correlation increased to 97%. This suggests that the physician could have a good guide for the selection of specific therapy within a few hours; confirmation of results would be available from the laboratory at the end of the 24 hour incubation period.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—BASS, J. A.; ENGLE, R. B.; MITCHELL, AND T. G., BLOCKER.
Evaluation of a rapid (hemoglobin reduction) method for determining antibiotic susceptibility of microorganisms. I. Preliminary evaluation using stock organisms. *Antib. and Chemo.* 7:140-145, 1957.

- 2.—BASS, J. A.; F. B. ENGLE; R. B. MITCHELL, AND T. G. BLOCKER.
Evaluation of a rapid (hemoglobin reduction) method for determining antibiotic susceptibility of microorganisms. II. Modification in technique. *Antib. and Chemo.* 7:160-165, 1957.
- 3.—BONDI, A.; E. H. SPAULDING; D. E. SMITH, AND C. C. DIETZ.
A routine method for the rapid determination of susceptibility to penicillin and other antibiotics. *Am. J. Med. Sci.* 213:221-225, 1947.
- 4.—BROWN, J. R.; R. W. BECK; J. M. WOODWARD, AND R. P. PORTER.
A rapid test for bacterial sensitivity to antibiotics. *Am. J. Clin. Path.* 35:10-13, 1961.
- 5.—HAHVS, F. J.; J. G. SANDS, AND E. O. BENNETT.
Antibiotic activity in the presence of agar. *Appl. Microbiol.* 15:31-34, 1967.
- 6.—JACKSON, J. L. W.; W. E. DYE, AND R. R. MITCHELL.
Use of hemoglobin indicator for rapid method of determining antibiotic susceptibility of microorganisms. *Texas Rep. Biol. and Med.* 12:171-172, 1954.
- 7.—KLEIN, M.; S. E. SCHORR; S. TASHMAN, AND A. D. HUNT.
Evaluation of oral, intravenous and intramuscular aureomycin and the correlation between the in vivo and in vitro activity. *Jour. Bact.* 60:159-169, 1950.
- 8.—MORLEY, D. C.
A simple method for testing the sensitivity of wound bacteria to penicillin and sulfathiazole by the use of impregnated blotting paper discs. *J. Path. Bact.* 57:379, 1945.
- 9.—PITAL, A.; D. T. DISQUE, AND J. M. LEISE.
A new rapid plate method for determining antibiotic sensitivity. *Antib. and Chemo.* 6:351-359, 1956.
- 10.—RAJAM, P. C., AND J. D. ADCOCK.
A rapid test for screening the sensitivity of *Staphylococci* to antibiotics. *Am. J. Clin. Path.* 23:1168-1172, 1953.
- 11.—UMAÑA, V., AND B. FERNÁNDEZ.
Prueba rápida de sensibilidad a antibióticos. II Comparación con la modificación de Bass y otros. *Acta Médica Costarricense*, Vol. 12, N° 2, págs. 51 a 54, 1969.
- 12.—VINCENT, J. G., AND H. W. VINCENT.
Filter paper disc modification of the oxford cup penicillin determinations. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 55:162, 1944.
- 13.—WICK, W. E.
Influence of antibiotic stability on the results of in vitro testing procedures. *Jour. Bact.* 87:1162-1170, 1964.