

Adición del Pol-10 al juego diagnóstico del sistema DIRAMIC y su influencia en el crecimiento y estudio de la susceptibilidad a antibióticos de patógenos urinarios

Fernando Travieso Ruiz, Gloria Roura Carmona, Angela M. Zayas y Orestes R. Contreras Alarcón.

Grupo DIRAMIC, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y Calle 158, Playa, Apartado 6990, Ciudad de La Habana, Cuba, Cuba.

Recibido: 20 de septiembre de 1997. Aceptado: 5 de mayo de 1998.

Palabras clave: Susceptibilidad a antibióticos, Bauer-Kirby, cultivos bacterianos, índice de crecimiento.
Key words: Susceptibility to antibiotic, Bauer-Kirby, bacterial cultures, growth index.

RESUMEN. Se evaluó la incorporación de un polímero lineal de naturaleza polisacárida, denominado Pol-10, al medio de cultivo del juego diagnóstico del sistema DIRAMIC; el cual es utilizado en los estudios de la susceptibilidad bacteriana a antibióticos. El polímero en cuestión fue seleccionado por su inocuidad a los microorganismos y por su estabilidad frente a las enzimas bacterianas. Se ensayaron tres intervalos diferentes de concentraciones del polímero (0,05-0,15; 0,16-0,25 y 0,26-0,35 %) incorporadas al caldo Müeller-Hinton. La incorporación del Pol-10 a una concentración en el intervalo de 0,05-0,15 %, posibilita la eliminación del efecto inhibitorio sobre el crecimiento microbiano de los productos catabólicos que acompañan al inóculo y consecuentemente aumenta el índice de crecimiento de los microorganismos probados, esto permite disminuir el tiempo de detección de las infecciones en el trabajo con muestras clínicas. Además, permite eliminar el efecto sinérgico entre los catabolitos y la actividad de los antibióticos, disminuyendo la incidencia de resultados falsos sensibles de un 15,2 a un 3,9 % en los estudios de susceptibilidad a antibióticos realizados a 329 aislamientos bacterianos procedentes de muestras clínicas. La correspondencia de la metodología del sistema DIRAMIC con la de referencia de Bauer-Kirby se elevó desde un 78,2 hasta un 83 %.

ABSTRACT. The addition of a linear polysaccharide polymer, named Pol-10, to the culture media of the DIRAMIC system's diagnostic kit was evaluated; this system is used in bacterial susceptibility test to antibiotics. The polymer Pol-10 was selected because it had no undesirable effects on microorganisms and for its stability to bacterial enzymes. Three different polymer concentration ranges were assayed (0,05-0,15; 0,16-0,25 y 0,26-0,35 %) added to the Müeller-Hinton Broth. The incorporation of Pol-10 at 0,05-0,15 % to the culture media, counteracts the inhibitory effect in the microbial growth of catabolic products accompanying the inoculi and therefore increases the indexes of microorganisms tested obtained; furthermore, detection time of infections in clinical specimens may be shortened. The synergic effect between catabolites and antimicrobial activity was also eliminated, decreasing the false sensitive results from 15,2 to 3,9 % in 329 cases from clinics. Correspondence levels of DIRAMIC system methodology with the Bauer-Kirby method varied from 78.2 to 83 %.

INTRODUCCION

La disponibilidad por parte de los laboratorios de microbiología clínica de métodos rápidos para la detección de infecciones que posibiliten disminuir el tiempo de espera por el resultado de un análisis, desempeña un papel decisivo en la preservación de la vida de pacientes graves hospitalizados y contribuye a evitar el empleo inadecuado de antibióticos.

El sistema DIRAMIC permite hacer el diagnóstico de las infecciones urinarias de origen bacteriano en sólo 4 h y el estudio de susceptibilidad a antibióticos, tanto de microorganismos aislados como previo aislamiento a partir de muestras infectadas, en igual período de tiempo, incluyendo el universo bacteriano definido y normalizado por la OMS.¹ Esto es posible mediante la detección de los cambios de turbidez que origina el crecimiento microbiano en el medio de cultivo.

En el esfuerzo por determinar las causas que afectan el nivel de correspondencia de los resultados del antibiograma del sistema DIRAMIC con los resultados que se obtienen con el método de referencia de Bauer-Kirby, se detectó un efecto inhibitorio de los productos catabólicos que acompañan al inóculo sobre el índice de crecimiento del germen involucrado y alteración en el esquema de susceptibilidad a antibióticos.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la posible utilidad de la adición del polisacárido lineal, denominado Pol-10, al medio de cultivo empleado en el juego diagnóstico del sistema DIRAMIC para eliminar los efectos indeseables referidos.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron cultivos de 24 h de las cepas de colección siguientes: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

El polímero adicionado fue seleccionado por su inocuidad a los microorganismos y por su estabilidad frente a las enzimas bacterianas y puede ser adicionado a la concentración empleada en la mayoría de los medios de cultivo utilizados en las investigaciones microbiológicas sin riesgo a que se produzcan interferencias en la función de estos.

Se trabajaron tres concentraciones diferentes de Pol-10 (0,05-0,15; 0,16-0,25 y 0,26-0,35 %), las cuales fueron incorporadas al caldo Müeller-Hinton empleado en el juego diagnóstico del sistema DIRAMIC.

Partiendo de los cultivos en placa Petri, se prepararon inóculos de las cepas de referencia con una turbidez equivalente al 0,5 de la escala McFarland en disolución salina. De ahí, se tomaron 150 µL y se inocularon frascos con 4,5 mL de caldo Müeller-Hinton sin modificar y frascos con el mismo caldo más las diferentes concentraciones de Pol-10. Dosecientos microlitros de cada muestra fueron depositados en las tiras de 16 pocillos de placas tipo microELISA que emplea el sistema DIRAMIC como soporte en la realización del antibiograma. Se realizaron 15 réplicas y se dejó el primer pocillo como control negativo del crecimiento, colocando en él medio sin inocular. Después de 4 h de incubación a 37 °C, se realizó la determinación del crecimiento microbiano en los pocillos utilizando el sensor del sistema DIRAMIC² y se compararon las medias de los índices de crecimiento alcanzados.

Seguidamente, se determinó el esquema de susceptibilidad a antibióticos de 329 aislamientos bacterianos procedentes de muestras clínicas empleando el sistema DIRAMIC, tanto en el medio sin Pol-10 como en el medio con polímero donde se obtuvieron los mayores índices de crecimiento y se compararon los resultados con los obtenidos por el método de referencia de Bauer-Kirby. Los

antibióticos probados fueron: amikacina, ampicilina, cefaloridina, cloramfenicol, colimicina, eritromicina, estreptomycin, gentamicina, kanamicina, metilicina, novobiocina, penicilina G y carbenicilina. El procedimiento seguido en la realización del método Bauer-Kirby fue el establecido por el Comité Nacional para Normas de Laboratorio Clínico de Estados Unidos.³

Para la realización del antibiograma con el sistema DIRAMIC se utilizaron inóculos preparados de la forma expuesta anteriormente. En las tiras donde se hacen las determinaciones se colocaron los discos de antibióticos y el medio inoculado, dejando el primer pocillo como control positivo (medio inoculado sin antibiótico) y el segundo, como control negativo (medio no inoculado sin antibiótico). La incubación fue similar.

RESULTADOS Y DISCUSION

Después de las 4 h de incubación, se detectó que la turbidez en los pocillos de las placas de microensayo no era homogénea en los medios donde se incorporó el Pol-10, ocurría una estratificación superficial del cultivo que aumentaba con el incremento de la concentración del polímero en el caldo. Esta estratificación fue más marcada en el caso de *P. aeruginosa*, hecho que se justifica por la incubación no agitada de las placas y por ser este un microorganismo de respiración aeróbica. Debido a esto se procedió a la homogeneización mecánica de las placas antes de realizar la determinación.

Los pocillos fueron analizados utilizando el sensor del sistema DIRAMIC y con los datos obtenidos, se calcularon los índices de crecimiento medio alcanzados en cada condición, así como los porcentajes de crecimiento logrados por cada cepa con respecto al crecimiento máximo a las diferentes concentraciones de Pol-10 trabajadas (Tabla 1).

La concentración de Pol-10 igual a 0,05-0,15 % resultó óptima para el crecimiento de *E. coli* y *P. aeruginosa*, con aumentos considerables de su valor numérico, no así para *S. aureus* para el que el mayor índice de crecimiento se obtuvo a una concentración de 0,26 a 0,35 % del polímero. En el caldo Müeller-Hinton sin el polímero adicionado, se obtuvieron los índices de crecimiento sin bajos de *S. aureus* y de *P. aeruginosa*. Por estos resultados y por ser *E. coli* responsable de un 80 % de los casos de las infecciones del tracto urinario en pacientes ambulatorios^{4,5} y de más de un 30 % de las nosocomiales,⁶ se decidió continuar el estudio con una concentración de Pol-10 en el intervalo de 0,05-0,15 %.

Los esquemas de susceptibilidad a antibióticos de los 329 aislamientos clínicos, obtenidos con el sistema DIRAMIC utilizando el caldo Müeller-Hinton y el modificado con 0,05-0,15 % de Pol-10, mostraron diferencias en su correspondencia con los obtenidos por el método de referencia de Bauer-Kirby. La adición del polímero permitió el aumento de este valor de un 78,2 a un 83 % (Tabla 2).

Tabla 1. Índices de crecimiento alcanzados por las cepas a las diferentes concentraciones de Pol-10.

Cepa	Concentración de Pol-10 (%)	Índice de crecimiento (uD) ^a n = 15	Crecimiento respecto al máximo (%)
<i>E. coli</i>	0,00	252,25	78,33
	0,05-0,15	322,02	100,00
	0,16-0,25	184,63	57,33
	0,26-0,35	175,37	54,46
<i>S. aureus</i>	0,00	97,75	50,23
	0,05-0,15	163,68	84,11
	0,16-0,25	124,63	64,04
	0,26-0,35	194,61	100,00
<i>P. aeruginosa</i>	0,00	47,53	43,64
	0,05-0,15	108,90	100,00
	0,16-0,25	53,45	50,92
	0,26-0,35	57,90	46,83

^a uD (unidades DIRAMIC para medir y expresar la turbidez).

Tabla 2. Distribución de los errores en el estudio de susceptibilidad a antibióticos en el medio sin modificar y modificado con 0,05-0,15 % de Pol-10.

Tipo de error	Caldo Mueller-Hinton			
	No modificado		Modificado	
	Errores	(%)	Errores	(%)
Muy grande ^a	50	15,2	13	3,9
Grande ^b	6	1,8	15	4,5
Menor ^c	16	4,9	28	8,5
Correspondencia (%)	78,2		83	

Total de muestras: 329.

^a Falsos sensibles (resultados sensibles que se obtuvieron por el sistema DIRAMIC y que fueron resistentes por el método Bauer-Kirby).

^b Falsos resistentes (resultados resistentes que se obtuvieron por el sistema DIRAMIC y que fueron sensibles por el método Bauer-Kirby).

^c Hay involucrados resultados intermedios obtenidos por uno de los dos métodos utilizados.

Significativamente provechosa resultó la incorporación del Pol-10 en relación con la disminución de los falsos sensibles de un 15,2 a un 3,9 %. Estas son respuestas sensibles del microorganismo ante un determinado antibiótico evaluadas por el sistema DIRAMIC y resistentes por el método de Bauer-Kirby que implican la administración de antibióticos inadecuados en el tratamiento de una infección.

Si se tiene en cuenta que este polímero es solamente metabolizable por un reducido número de microorganismos, los cuales no se encuentran comúnmente en las muestras que se analizan con el sistema, se evidencia su efecto desinhibidor en el medio de cultivo donde es adicionado al absorber o adsorber, o ambas cosas, los catabolitos incorporados involuntariamente junto al inóculo; obteniéndose mayores índices de crecimiento de las bacterias

involucradas en las infecciones en un menor tiempo, comparado con el requerido cuando es utilizado el medio sin polímero. Además, al neutralizar estos catabolitos hace específica la actividad antimicrobiana de los antibióticos, atribuyéndose sólo a estos la inhibición del crecimiento de las bacterias en los estudios de susceptibilidad.

CONCLUSIONES

La incorporación del polisacárido lineal (Pol-10) a una concentración en el intervalo de 0,05-0,15 %, al caldo Mueller-Hinton, utilizado en el juego diagnóstico del sistema DIRAMIC posibilita eliminar el efecto inhibitorio de los productos catabólicos que acompañan al inóculo sobre el crecimiento microbiano y por tanto, aumentar el índice de crecimiento de los microorganismos presentes en la muestra a analizar

disminuyendo el tiempo de detección de las infecciones.

Además, con la incorporación del Pol-10, se elimina el efecto sinérgico de los catabolitos con la actividad de los antibióticos contra los gérmenes causantes de infecciones, disminuyendo de un 15,2 a un 3,9 % la incidencia de resultados falsos sensibles en los estudios de susceptibilidad a antibióticos que se realicen con el sistema DIRAMIC. La correspondencia de este método con el de referencia de Bauer-Kirby se eleva desde un 78,2 hasta un 83 %.

BIBLIOGRAFIA

1. Comité de Expertos de la Organización Mundial de la Salud en Patrones Biológicos Normas para Sustancias Biológicas No. 26, revisión 1981, 32 Informe, Serie de Informes Técnicos 673. OMS, Ginebra, 156-192, 1982.
2. Grupo DIRAMIC, Centro Nacional de Investigaciones Científicas. Manual de Usuario DIRAMIC-10, V. 2.5, revisión 1995.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard, Document M2-A5, Vol.13, No.24. 5th Ed., NCCLS, Pennsylvania, 1993.
4. James J.M. y Testa H.J. Imaging techniques in the diagnosis of urinary tract infection. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 3, 660, 1994.
5. Eisenstadt J. y Washington J.A. Diagnostic microbiology for bacteria and yeasts causing urinary tract infections, Chapter II, Urinary tract infections. Molecular pathogenesis and clinical management. Ed. Mobley H.L.T. y Warren J.W., ASM Press, Washington, 29-66, 1996.
6. Donnenberg M.S. y Rodney A.W. Virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli*, Chapter VI, Urinary tract infections. Molecular pathogenesis and clinical management. Ed. Mobley H.L.T. y Warren J.W., ASM Press, Washington, 135-174, 1996.