



X Jornades d'actualització científica Formació del professorat de secundària

TALLER

LES RESISTÈNCIES ALS ANTIBIÒTICS

Com es valora si un bacteri és resistent a un antibiòtic?

Febrer 2012



Guia confeccionada per

Susana Campoy

Maria Pilar Cortés

Montserrat Llagostera

Unitat de Microbiologia, Departament de Genètica i de Microbiologia (UAB)

<http://www.uab.cat/departament/genetica-microbiologia/>

Grupo de Docencia y difusión de la Sociedad Española de Microbiología (SEM) <http://www.semicrobiologia.org/ddm/index.php>

Índex¹

	Pàg.
BLOC I. Mutagènesi espontània i pressió selectiva	1
Activitat 1: La mutagènesi espontània	1
1.1 Demostració de la mutagènesi espontània	2
1.2 Determinació de la freqüència de mutació espontània	4
Activitat 2: La pressió selectiva	5
BLOC II. Determinació de la susceptibilitat a agents antimicrobians	7
Activitat 3: Concentració Mínima Inhibitòria (tècnica del test EPSILON)	8
Activitat 4: Antibiograma (mètode de Kirby-Bauer)	11
REFERÈNCIES	15
ANNEX²	16

¹ Les imatges del text pertanyen al grup de Microbiologia Molecular del Departament de Genètica i de Microbiologia (UAB) o bé són de l'ASM Microbe Library (<http://www.microbelibrary.org/>)

² Les soques bacterianes i alguns dels medis i materials es poden sol·licitar a CESIRE-CDEC (Passeig Vall Hebrón, 64-70, Annex CEIP Josep M. de Sagarra, Barcelona 08023) <http://phobos.xtec.cat/cdec/>

BLOC I. Mutagènesi espontània i pressió selectiva

La mutació espontània és una de les causes de la resistència als agents antimicrobians. L'existència d'aquestes mutacions en els genomes de les cèl·lules bacterianes, juntament amb la pressió selectiva que exerceix la presència dels antimicrobians, fa que els mutants capaços de sobreviure se seleccionin, emergint així els clons resistents a aquests compostos.

En aquest taller es proposen dues activitats relacionades amb els conceptes de mutació espontània i de pressió selectiva.

Activitat 1: La mutagènesi espontània

En aquesta activitat es pretén demostrar el fenomen de la mutagènesi espontània, observant que les poblacions bacterianes contenen mutants espontanis. El bacteri utilitzat és *Rhodobacter sphaeroides*, un bacteri del sòl, gramnegatiu, quimioorganotròfic i fotosintètic (1). Aquest microorganisme sintetitza carotens com a pigments fotosintètics, els quals confereixen a les cèl·lules i a les colònies d'aquest microorganisme un color vermell característic. Diferents mutacions en la ruta de biosíntesi de carotens donen lloc a un canvi de color de la cèl·lula i, consegüentment, de les colònies. Per tant, l'observació de colònies no vermelles demostra l'existència de mutants espontanis de pigmentació en la població bacteriana.

Les colònies dels mutants espontanis de color verd pàl·lid que s'observen en les plaques són conseqüència d'errors en la replicació del DNA, sent la addició d'una guanina en un determinat lloc del gen *crtD*, implicat en la síntesi de carotens, un dels errors més freqüents. Aquesta addició provoca un corriment de la pauta de lectura d'aquest gen i per tant se sintetitza un enzim no funcional. La incorporació errònia d'aquesta guanina es produeix a la regió inicial del gen, concretament en una zona que conté 7 guanines seguides. La presència d'aquesta poli-G en la seqüència del gen, juntament amb la generació d'estructures secundàries en aquesta zona, justifiquen l'elevada freqüència de mutació que presenta aquest bacteri fotosintètic en aquest lloc (1).

Material i equipament

- *R. sphaeroides* 2.4.1
- Medi 290A líquid
- Plaques de medi 290A
- Ampolla de 100 ml estèril
- Nanses de Digrafsky
- Nanses de Kolle
- Pipetes estèrils
- Tubs de vidre o d'un sol ús transparents i estèrils
- Tubs d'un sol ús estèrils
- Estàndard 0,5 McFarland o espectrofotòmetre
- Estufa a 30°C

1.1. Demostració de la mutagènesi espontània

Tot seguit es descriu el protocol a seguir.

- (a) Sembrar una estria per esgotament de nansa de *R. sphaeroides* en una o dos plaques de medi 290A i incubar a 30°C durant 3 dies. Incubar-les invertides dins d'una bossa de plàstic tancada per evitar la seva dessecació.
- (b) Recollir biomassa de les plaques anteriors amb una nansa de Kolle per tal d'obtenir una suspensió de *R. sphaeroides* en 5 ml de medi líquid 290A de 1×10^8 cfu/ml³ aproximadament, segons els procediments que s'indiquen al final d'aquest apartat.
- (c) Diluir 10^{-4} i 10^{-5} la suspensió bacteriana obtinguda en medi líquid 290A.
- (d) Sembrar 3 plaques de medi 290A amb 0,1 ml de cada dilució.

³ CFU, colony forming unit (unitat formadora de colònia)

- (e) Incubar les plaques a 30°C durant 3-5 dies, seguint les instruccions indicades en el punt (a).
- (f) Observar el creixement i identificar les colònies que no presenten color vermell. Aquestes colònies procedeixen de les cèl·lules mutants que hi havia a la població bacteriana inicial.

NOTA. Per obtenir la suspensió de *R. sphaeroides* de 1×10^8 cfu/ml indicada en el punt (a) es pot fer servir un dels següents mètodes:

McFarland: Amb l'ajut d'una nansa estèril es van recollint colònies de la placa i es van resuspenent en 5 ml de medi líquid 290A fins aconseguir una terbolesa equivalent a la que s'observa en un tub de 0,5 de l'escala McFarland (veure annex per preparar l'estàndard de terbolesa 0,5) (2)



Fig. 1. Imatge de diferents concentracions de l'escala McFarland

Espectrofotometria: També es pot ajustar la concentració cel·lular de la suspensió utilitzant un espectrofotòmetre. En aquest cas la concentració de 1×10^8 cfu/ml s'obté ajustant l'absorbància de la suspensió a una longitud d'ona de 550 nm a 0,3 unitats. Aquest valor pot variar mínimament segons l'espectrofotòmetre.

1.2. Determinació de la freqüència de mutació espontània

A criteri del professorat, l'activitat anterior es pot realitzar de manera més completa, demostrant el fenomen biològic de la mutagènesi espontània i calculant la freqüència de mutació de la pigmentació de vermell a verd en *R. sphaeroides*. Per realitzar aquest estudi, es fa servir el següent protocol:

- (a) Seguir els passos (a) i (b) del procediment anterior per tal d'aconseguir una suspensió bacteriana de *R. sphaeroides* a una concentració de 1×10^8 cfu/ml.
- (b) Diluir la suspensió en medi 290A fins a obtenir les dilucions 10^{-4} , 10^{-5} i 10^{-6} .
- (c) Sembrar 3 plaques de medi 290A amb 0,1 ml de les dilucions 10^{-4} , 10^{-5} i 10^{-6} .
- (d) Incubar a 30°C durant 3-5 dies, segons s'ha indicat en el procediment anterior.
- (e) Identificar per observació els mutants de pigmentació en les plaques on s'han sembrat les dilucions 10^{-4} i 10^{-5} . Comptar el nombre de clons mutants.
- (f) Calcular el nombre de mutants per ml de suspensió, segons la fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ mutants /ml} = \frac{\text{N}^\circ \text{ mutants}}{\text{Volum sembrat} \times \text{dilució}}$$

- (g) Comptar el nombre de colònies de les plaques de les dilucions 10^{-5} i 10^{-6} , tenint en compte que seran vàlides les plaques que continguin entre 15 i 300 colònies.
- (h) Calcular el nombre de cèl·lules viables per ml de suspensió segons la fórmula:

$$\text{cfu /ml} = \frac{\text{N}^\circ \text{ colònies}}{\text{Volum sembrat} \times \text{dilució}}$$

- (i) Calcular la freqüència de mutació segons:

$$\text{Freqüència de mutació} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ mutants/ml}}{\text{cfu/ml}}$$

(j) Interpretar el significat del resultat. Per exemple, si la freqüència és de 1×10^{-5} , significa que per cada 100.000 cèl·lules de *R. sphaeroides*, 1 és un mutant de pigmentació. És a dir, segurament, si es tracta d'una colònia verda, la cèl·lula que l'ha originat contenia l'addició d'una guanina en la poli-G del gen *ctrD*. Aquesta addició ha provocat un canvi en la pauta de lectura del gen i, per tant, un enzim no funcional que impedeix la síntesi correcta de carotens.

Activitat 2. La pressió selectiva

Aquesta segona activitat està dirigida a demostrar la pressió selectiva que exerceix la presència d'un antimicrobià sobre les cèl·lules sensibles i sobre els mutants espontanis resistents.

Es treballa amb una soca d'un bacteri gramnegatiu (*Escherichia coli* DH5) i amb rifampicina com a agent antimicrobià. Aquest procediment demostra que si el medi de cultiu conté rifampicina, la seva pressió selectiva fa que només es desenvolupin aquelles cèl·lules que contenen una mutació espontània que els confereixi resistència a aquest antibacterià.

La rifampicina actua interaccionant amb la RNA polimerasa bacteriana i, com a conseqüència, provoca la inhibició de la transcripció del DNA. La cèl·lula morirà perquè no pot sintetitzar RNA (3). Una cèl·lula resistent a la rifampicina conté una mutació en el gen que codifica la RNA polimerasa que impedeix que la rifampicina interaccioni amb l'enzim però que no afecta significativament la seva activitat. Per tant, el procés de transcripció serà normal i la cèl·lula podrà desenvolupar-se en presència de rifampicina. (3, 4)

Material i equipament

- *Escherichia coli* DH5
- Plaques de medi LB

- Plaques de medi LB/rifampicina (0,075mg/ml)
- Rifampicina (30 mg/ml)
- Solució salina
- Nanses de Digrafsky
- Nanses de Kolle
- Pipetes estèrils
- Tubs de vidre o d'un sol ús transparents i estèrils
- Tubs d'un sol ús estèrils
- Estàndard 0,5 McFarland o espectrofotòmetre
- Estufa a 37°C

Protocol⁴

- (a) Preparar una suspensió d'*E. coli* en solució salina a una concentració de 1×10^8 cfu/ml, ajustant la concentració amb l'estàndard 0,5 de McFarland o per espectrofotometria a una absorbància de 0,3 a una longitud d'ona de 450 nm.
- (b) Sembrar 4 plaques de LB/rifampicina amb 0,3 ml de la suspensió bacteriana.
- (c) Sembrar 1 placa de LB amb 0,3 ml de la suspensió bacteriana.
- (d) Incubar les plaques de 16 a 48 h a 37°C.
- (e) Observar que la presència de rifampicina en les plaques de LB fa que només creixin unes poques colònies, mentre que en les plaques de LB sense rifampicina es desenvolupa una gespa bacteriana en tota la placa.

⁴ A criteri del professorat, aquest protocol es pot completar calculant la freqüència de mutació. Per això caldrà realitzar dilucions de la suspensió bacteriana inicial per determinar la concentració de viables i calcular el nombre de mutants per ml, segons s'ha descrit en l'apartat 1.2 de l'activitat anterior. En aquest cas, les dilucions es poden fer en solució salina.

BLOC II. Determinació de la susceptibilitat als agents antimicrobians

L'estudi de la susceptibilitat dels microorganismes als antimicrobians és una de les tasques habituals dels laboratoris de microbiologia clínica. L'objectiu final és classificar el bacteri d'estudi en sensible, intermedi o resistent a un determinat agent en funció de la concentració mínima inhibidora (CMI) que presenti davant aquest antimicrobià.

La CMI es defineix com la concentració mínima d'antimicrobià que impedeix el creixement del bacteri *in vitro* (2). Entitats com el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) determinen els protocols estàndard per a la determinació de la CMI dels microorganismes patògens front als diferents agents antimicrobians. A més, a través de l'estudi de moltes soques control, el CLSI elabora taules de referència en les que es correlaciona la CMI de cada espècie patògena amb la categoria de sensible, intermedi o resistent per a cada agent (5).

Es considera que un bacteri presenta resistència intermèdia quan el valor de la CMI per un determinat antimicrobià s'aproxima a les concentracions d'aquest agent en sang o teixits i, per tant, pot esperar-se una eficiència clínica satisfactòria en aquells llocs en els que la concentració de l'antimicrobià és elevada o quan s'administra a una dosi superior a l'habitual.

Per contra, un microorganisme és resistent a un antimicrobià quan no inhibeix el seu creixement a la concentració que s'obté en sang o teixits. Finalment, un microorganisme és sensible quan la CMI és inferior a la concentració d'aquest agent en sang o teixits (2).

En aquesta activitat es proposa la realització de dues tècniques àmpliament utilitzades com són el test EPSILON (o E-test®) i el mètode de Kirby-Bauer o antibiograma disc-placa.

Activitat 3. Concentració Mínima Inhibitòria (tècnica del test EPSILON)

El mètode del test EPSILON, també conegut com a E-test® (bioMérieux), és un mètode quantitatiu, àmpliament utilitzat. El mètode permet determinar la CMI d'un bacteri concret front un determinat antibacterià, mitjançant una lectura directa. És una tècnica senzilla i ràpida que es correlaciona molt bé amb el mètode estàndard de dilució del CLSI per a l'estudi de la CMI.

L'E-test® és una adaptació de la tècnica de difusió en disc. Es tracta d'una tira de plàstic no porosa de 6 cm de llarg per 5 mm d'ample que incorpora en una de les seves cares un gradient de 15 dilucions d'un antibacterià les quals s'indiquen en forma d'escala graduada en la cara no impregnada. Aquesta tira es diposita sobre una placa d'agar, prèviament inoculada amb el microorganisme que es pretén estudiar. D'aquesta manera es produeix de forma immediata una difusió de l'antibacterià des del suport de plàstic fins a l'agar, generant-se, al llarg de la tira, un gradient exponencial de concentració. Després d'incubar les plaques es pot observar, com a resultat de la difusió, una zona d'inhibició el·lipsoïdal i simètrica. La CMI és el valor indicat en la intersecció entre l'extrem de la inhibició i la tira graduada de l'E-test®. En funció d'aquesta CMI es pot catalogar al bacteri com a sensible, intermedi o resistent a l'antimicrobià assajat, segons les categories establertes per el CLSI.



Figura 2. Assaig E-test® de *Staphylococcus aureus* front dos antibacterians

En aquesta activitat es determinarà la CMI d'un bacteri grampositiu (*Bacillus subtilis*) i d'un gramnegatiu (*E. coli* DH5) front a l'antibiòtic ampil·lina .

Material i equipament

- *E. coli* DH5 i *Bacillus subtilis* ATCC 6633.
- Plaques de medi Mueller-Hinton⁵
- Solució salina
- Tires de E-test^{®6}
- Escovillons estèrils
- Nanses de sembra
- Tubs de vidre o d'un sol ús transparents i estèrils
- Estàndard 0,5 McFarland o espectrofotòmetre
- Estufa a 35°C
- Pinces

Protocol

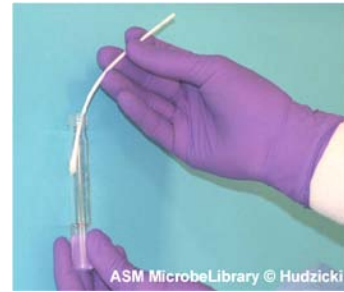
- (a) Se sembren per la tècnica de l'esgotament de nansa *E. coli* i *B. subtilis* en plaques de Mueller-Hinton i s'incuben a 35°C⁷ durant 24 h.
- (b) Per a cada bacteri es prepara una suspensió cel·lular en solució salina, ajustant la concentració a 0,5 de McFarland o per espectrofotometria a una absorbància de 0,3 i 0,4, per *E. coli* i *B. subtilis*, respectivament, a una longitud d'ona de 450 nm.
- (c) Abans que passin 15 min d'haver ajustat la suspensió, utilitzar-la per sembrar per a cada soca una placa de medi Mueller-Hinton, fent servir un escovilló estèril. La sembra ha de garantir un cultiu homogeni per tota la placa, per això es recomana seguir les següents indicacions:

⁵ El mètode estandarditzat usa medi Mueller-Hinton, però per pràctiques demostratives es pot fer servir LB o qualsevol medi nutritiu ric.

⁶ És important tenir en compte les condicions de conservació i la data de caducitat. Les tires han d'estar sempre protegides de la humitat i han d'atemperar-se a temperatura ambient com a mínim 30 minuts abans del seu ús.

⁷ Òptimament, *B. subtilis* s'hauria d'incubar a 30°C i *E. coli* a 37°C.

- Abans de passar l'escovilló impregnat amb la suspensió bacteriana per la placa de medi, rotar-diverses vegades contra la paret del tub per sobre del nivell de la suspensió, evitant així l'excés de líquid.



lo

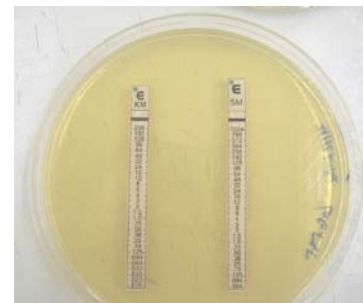
- Passar l'escovilló per la superfície de l'agar tres vegades, rotant la placa uns 60° cada cop i passant-la finalment per la perifèria de l'agar per aconseguir una sembra uniforme.



(d) Deixar assecar la placa de 10 a 15 minuts abans de dipositar la tira de E-test[®]. En aquest cas, és molt important que la placa estigui **COMPLETAMENT** seca abans de dipositar la tira per evitar distorsions en la difusió de l'antibacterià.

(e) Amb l'ajut d'unes pinces estèrils, dipositar la tira E-test[®] sobre la placa inoculada i

seca. La tira s'ha de dipositar amb la cara en la que s'indica l'escala de CMI orientada cap amunt i amb la concentració màxima propera a l'extrem de la placa de petri. Cal assegurar que la tira contacta completament amb la superfície de l'agar, evitant que es formin gotes d'aire entre la tira i l'agar. Per eliminar-les es pot pressionar



Molecular Microbiology Group-UAB

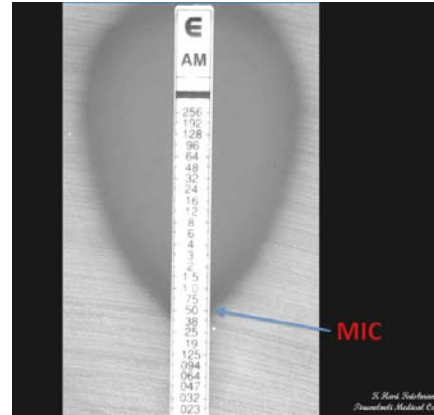
lleugerament la tira contra l'agar amb unes pinces estèrils. Un cop dipositada la tira és molt important no moure-la, ja que un cop contacta amb l'agar, l'antibiòtic comença a difondre molt ràpidament.

(f) Incubar les plaques a 35°C⁹ durant 16-24 h.

⁸ Recordar que abans del seu ús les tires d' E-test[®] han d'estar 30 min a temperatura ambient.

⁹ Òptimament, *B. subtilis* s'hauria d'incubar a 30°C i *E. coli* a 37°C.

(g) Procedir a la lectura dels resultats observant la zona d'inhibició el·lipsoïdal i simètrica que apareix al voltant de la tira de l' E-test®. La CMI es el valor que s'indica en l'escala graduada de l' E-test® en el punt d'intersecció entre l'extrem d'inhibició de l'el·lipse i la tira. Si s'observen interseccions diferents entre les dues bandes de la tira, la CMI serà el valor superior sempre i quan la diferència entre els dos valors no sigui superior a la meitat d'un pas de dilució doble. Si la diferència és més gran caldrà repetir l'assaig.



Activitat 4. Antibiograma (mètode de Kirby-Bauer)

Aquest és un mètode qualitatiu que permet l'avaluació en el laboratori de la resposta d'un microorganisme a un o diversos antimicrobians. L'antibiograma disc-placa, basat en el treball de Kirby, Bauer i col·laboradors, és un dels mètodes que el CLSI recomana per a la determinació de la susceptibilitat bacteriana als antimicrobians.

El mètode consisteix en dipositar sobre la superfície de l'agar d'una placa de Petri, prèviament inoculada amb el microorganisme d'estudi, un o més discs de cel·lulosa impregnats, cada un d'ells, amb una concentració determinada d'un antimicrobià. Quan el disc es posa en contacte amb la superfície de l'agar, l'antibiòtic difon al medi de forma radial, formant-se un gradient de concentració. Després del període d'incubació es pot observar, al voltant del disc, un halo d'inhibició degut a que s'ha impedit el creixement bacterià. La concentració d'antibiòtic en la interfase entre el creixement bacterià i la zona d'inhibició es coneix com a concentració crítica i s'aproxima a la CMI obtinguda pels mètodes de dilució i de l'E-test®. De fet existeixen taules estandarditzades pel CLSI per a cada patogen que correlacionen el diàmetre de l'halo d'inhibició amb la CMI d'un

antibacterià que permeten catalogar el microorganisme com a sensible, intermedi o resistent.



Figura 3. Antibiograma disc-placa d'una soca de *Pseudomonas aeruginosa* front a diferents antimicrobians.

En aquesta activitat es determinarà la susceptibilitat a ampicil·lina, estreptomicina, cloramfenicol i tetraciclina de la soca *E. coli* DH5 i del mutant espontani *E. coli* HB101Str^R.

Material i equipament

- *E. coli* DH5 i *E. coli* HB101Str^R
- Discs d'ampicil·lina (10 µg), cloramfenicol (30 µg), estreptomicina (10 µg) i tetraciclina (30 µg)¹⁰
- Plaques de Mueller-Hinton¹¹
- Solució salina
- Escovillons estèrils
- Nanses de Kolle
- Tubs de vidre o d'un sol ús transparents i estèrils

¹⁰ Els discs s'han de conservar-se segons les especificacions del fabricant i, abans del seu ús, s'han de mantenir 1 h a temperatura ambient.

¹¹ El mètode estandarditzat usa medi Mueller-Hinton, però per pràctiques demostratives es pot fer servir LB o qualsevol medi nutritiu ric.

- Estàndard 0,5 McFarland o espectrofotòmetre
- Estufa a 37°C
- Pinces

Protocol

- (a) De forma anàloga al descrit en l'activitat anterior se sembra per a cada soca una placa de Mueller-Hinton i s'incuba a 37°C durant 24 h.
- (b) Per a cada soca es prepara una suspensió cel·lular en solució salina, ajustant la concentració a 0,5 de McFarland o per espectrofotometria a una absorbància de 0,3 a una longitud d'ona de 450 nm.
- (c) Abans de que passin 15 min d'haver ajustat la suspensió, utilitzar-la per sembrar de forma homogènia una placa de Mueller-Hinton per a cada soca, segons s'ha indicat en l'activitat 3.
- (d) Deixar assecar la placa de 3 a 5 minuts abans de dipositar els discs¹².
- (e) Col·locar els discs impregnats amb els antibiòtics amb unes pinces estèrils.

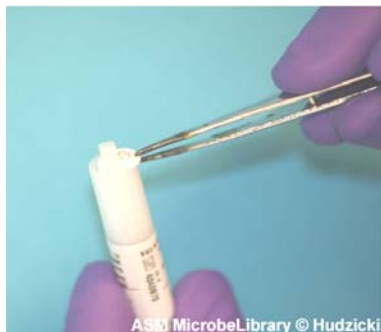
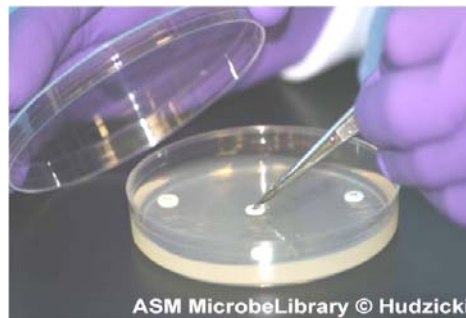


Figura 4. Seqüència per a la col·locació dels discs sobre les plaques Mueller Hinton.

- (f) Cal assegurar-se que la superfície del disc contacti perfectament amb l'agar de la placa. Per això, es recomana pressionar-los lleugerament un cop col·locats sobre la placa.



¹² Recordar que abans del seu ús els discs han d'estar 1 h a temperatura ambient.

(g) Un cop dispensats els discs, les plaques s'incuben invertides a 37°C de 16 a 24 h.

(h) Procedir a la lectura dels resultats observant la mida de l'halo d'inhibició al voltant dels discs de cada antibiòtic. Interpretar els resultats obtinguts, utilitzant la següent taula en la que es relaciona el diàmetre de l'halo amb la CMI per poder determinar si el microorganisme és resistent, intermedi o sensible a l'antibiòtic assajat.



Tabla 1. Patrones estándar del halo de inhibición, puntos de corte equivalente a la CMI para enterobacterias^a y diámetro del halo de inhibición para la cepa *E. coli* ATCC25922 empleada como control de calidad

GRUPO	Antimicrobiano	Carga del disco (µg)	Diámetro del halo de inhibición (mm)			Punto de corte Equivalente a la CMI (µg/ml)		<i>E. coli</i> ATCC 25922 intervalo ^b
			Resistente	Intermedia	Sensible	Resistente	Sensible	
A	Ampicilina ^{a,c}	10	<13	14-16	≥17	>32	<8	16-22
	Cefalotina ^{c,d}	30	<14	15-17	≥18	>32	<8	15-21
	Cefazolina ^{c,e}	30	<14	15-17	≥18	>32	<8	23-29
	Gentamicina ^c	10	<12	13-14	≥15	>8	<4	19-26
B	Amoxicilina/ácido clavulánico	20/10	<13	14-17	≥18	>16/8	<8/4	19-25
	Ampicilina/sulbactam	10/10	<11	12-14	≥15	>32/16	<8/4	20-24
	Piperacilina/tazobactam	100/10	<17	18-20	≥21	>128/4	<16/4	24-30
	Ticarcilina/ácido clavulánico	75/10	<14	15-19	≥20	>128/2	<16/2	25-29
	Mezlocilina	75	<17	18-20	≥21	≥128	<64	23-29
	Ticarcilina	75	<14	15-19	≥20	≥128	<16	24-30
	Piperacilina	100	<17	18-20	≥21	≥128	<16	24-30
	Cefamandol	30	<14	15-17	≥18	>32	<8	26-32
	Cefonicid	30	<14	15-17	≥18	>32	<8	25-29
	Cefuroxima (oral)	30	<14	15-22	≥23	>32	<4	20-26
	Cefpodoxima	10	<17	18-20	≥21	>8	<2	23-28
	Cefixima	5	<15	16-18	≥19	>4	<1	23-27
	Cefoxitina	30	<14	15-17	≥18	>32	<8	23-29
	Cefotetan	30	<12	13-15	≥16	>64	<16	28-34
	Cefmetazol	30	<12	13-15	≥16	>64	<16	26-32
	Cefoperazona ^a	75	<15	16-20	≥21	>64	<16	28-34
	Cefotaxima ^{a,d}	30	<14	15-22	≥23	>64	<8	29-35
	Ceftizoxima ^a	30	<14	15-19	≥20	>32	<8	30-36
	Ceftioxona ^{a,d}	30	<13	14-20	≥21	>64	<8	29-35
	Cefepima	30	<14	15-17	≥18	>32	<8	29-35
	Imipenem	10	<13	14-15	≥16	>16	<4	26-32
	Meropenem	10	<13	14-15	≥16	>16	<4	28-34
	Amikacina	30	<14	15-16	≥17	>32	<16	19-26
Ciprofloxacino ^{a,c}	5	<15	16-20	≥21	>4	<1	30-40	
Levofloxacino	5	<13	14-16	≥17	>8	<2	29-37	
Trimetoprim/sulfametoxazol ^{a,c}	1,25/23,75	<10	11-15	≥16	>8/152	<2/38	24-32	
C	Ceftazidima ^a	30	<14	15-17	≥18	>32	<8	25-32
	Aztreonam ^a	30	<15	16-21	≥22	>32	<8	28-36
	Kanamicina	30	<13	14-17	≥18	>25	<6	17-25
	Netilmicina	30	<12	13-14	≥15	>32	<12	22-30
	Tobramicina	10	<12	13-14	≥15	>8	<4	18-26
	Tetraciclina ^a	30	<14	15-18	≥19	>16	<4	18-25
D	Cloranfenicol ^a	30	<12	13-17	≥18	>32	<8	21-27
	Carbenicilina	100	<19	20-22	≥23	>64	<16	23-29
	Cinoxacino	100	<14	15-18	≥19	>64	<16	26-32
	Lomefloxacino	10	<18	19-21	≥22	>8	<2	-
	Norfloxacino	10	<12	13-16	≥17	>16	<4	28-35
	Ofloxacino	5	<12	13-15	≥16	>8	<2	29-33
	Loracarbef	30	<14	15-17	≥18	>32	<8	23-29
	Nitrofurantoina	300	<14	15-16	≥17	>128	<32	20-25
	Sulfisoxazol	250 o 300	<12	13-16	≥17	>350	<100	15-23
	Trimetoprim	5	<10	11-15	≥16	>16	<4	21-28
Fosfomicina	200	<12	13-15	≥16	>256	<64	22-30	

Elaborado con datos del NCCLS, 2000

a) Para aislamientos de *Salmonella* y *Shigella* spp. debemos ensayar e informar rutinariamente solo ampicilina, una quinolona, y trimetoprim-sulfametoxazol. Además, el cloranfenicol y cefalosporinas de tercera generación deben ser estudiadas e informadas para *Salmonella* aisladas como causa de infecciones extraintestinales.

b) Además de *E. coli* ATCC25922, estudiar *E. coli* ATCC 35218 cuando se ensayan combinaciones con inhibidores de β-lactamasa. Los intervalos aceptables para *E. coli* ATCC 35218 son los siguientes: amoxicilina/ácido clavulánico de 18 a 22 mm; ampicilina/sulbactam, de 13 a 19 mm; ticarcilina/ácido clavulánico de 21 a 25 mm y piperacilina/tazobactam, de 24 a 30 mm.

c) Puede además ser apropiado para obtener información sobre cepas aisladas del tracto urinario, junto con antimicrobianos del grupo D.

d) Cefalotina representa a cefapirina, cefradina, cefalexina, cefaclor y cefadroxilo. Cefazolina, cefuroxima, cefprozil y loracarbef deben ser ensayados individualmente ya que pueden ser activos aunque la cefalotina no lo sea.

e) Cepas de *Klebsiella* spp. y *E. coli* pueden ser resistentes a cefalosporinas y aztreonam mediante producción de β-lactamasas de espectro extendido; a pesar de la aparente sensibilidad "in vitro", algunas cepas pueden ser reconocidas por resultados intermedios o resistentes a ceftazidima y aztreonam (o cefotaxima, cefpodoxima, ceftioxona y ceftizoxima) y frecuentemente son resistentes a otros antimicrobianos como aminoglicósidos y trimetoprim-sulfametoxazol. Las cepas con β-lactamasas de espectro-extendido deben ser informadas como resistentes a las cefalosporinas y al aztreonam.

f) Ciertas cepas de *Citrobacter*, *Providencia* y *Enterobacter* spp. pueden presentar resultados falsamente sensibles con discos de loracarbef, por lo que los aislamientos de estos géneros no deben ser ensayados frente a este antimicrobiano.

REFERÈNCIES

- (1) Garí E, Gibert I, Barbé J. 1992. [Spontaneous and reversible high-frequency frameshifts originating a phase transition in the carotenoid biosynthesis pathway of the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1.](#) Molecular General Genetics 232:74-80.
- (2) Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/>
- (3) Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. 2009. Brock. Biología de los microorganismos. 12ªedició. Pearson Educación.
- (4) Walsh C. 2003. Antibiotics: Actions, Origins, resistance. ASM Press.
- (5) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). <http://www.clsi.org/>

ANNEX

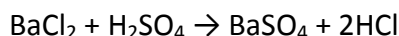
Solucions i medis de cultiu

Solució estàndard de McFarland 0,5

Cal preparar les següents solucions:

- A: Solució aquosa de clorur de bari dihidratat ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a l'1,175% (p/v)
- B: Solució aquosa d'àcid sulfúric (H_2SO_4) a l'1% (v/v)

Es mescla en una ampolla de vidre tapada 0,5 ml de la solució A amb 99,5 ml de la solució B. Es distribueixen alíquotes de 5 ml de la suspensió en tubs transparents amb tap i es guarden a la foscor a temperatura ambient. La reacció que es produeix és la següent:



El BaSO_4 forma un precipitat, que resuspès té una terbolesa aproximadament igual a la de $1-2 \times 10^8$ cèl·lules d'*E. coli* per ml. En el mercat existeixen solucions estàndard de 0,5 de McFarland preparades i fins i tot suspensions de partícules de làtex que aconsegueixen la mateixa funció.

Solució salina estèril

- Pesant 0,85 g de NaCl i dissoldre en un volum final de 100 ml.
- Esterilitzar a 121°C durant 15 min o filtrar la solució a través de un filtre de membrana de 0,45 µm.

Solució de rifampicina (30 mg/ml)

- Pesant 30 mg de rifampicina i dissoldre en 10 ml de metanol. Agitar fins a la seva completa dissolució.
- Conservar a -20°C protegit de la llum envoltant el tub amb paper d'alumini.

Medi líquid 290A

Triptona	1 g
Extracte de llevat	0,5 g
NaCl	1 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,0375 g
Glucosa monohidratada	0,1 g
Aigua destil·lada	1000 ml

Pesar els components i afegir aigua destil·lada fins enrasar a un volum d'1 L. Agitar fins a la completa dissolució de tots els components. Si és necessari escalfar fins a 50°C. Esterilitzar amb autoclau a 121°C durant 15 min. Si es considera necessari, repartir en tubs abans de l'esterilització.

Medi sòlid 290A

Preparar el medi igual que en l'apartat anterior, incorporant 15 g d'agar-agar per 1 L. Escalfar fins a la completa dissolució dels components. Esterilitzar amb autoclau a 121°C durant 15 min. Deixar refredar fins a una temperatura de 50-65°C. Dispensar en plaques de Petri.

Medi sòlid Luria-Bertani (LB)

Triptona	10 g
Extracte de llevat	5 g
NaCl	10 g
Agar-agar	15 g
Aigua destil·lada	1000 ml

Pesar els components i afegir aigua destil·lada fins enrasar a un volum d'1 L. Agitar i escalfar fins a la completa dissolució de tots els components. Esterilitzar amb autoclau a 121°C durant 15 min. Deixar refredar fins a una temperatura de 50-65°C. Dispensar en plaques de Petri.

Medi sòlid LB/rifampicina

Les plaques de LB amb rifampicina a una concentració final de 0,075mg/ml es poden preparar de dues maneres diferents, tot i que la primera és la més recomanable perquè la concentració de rifampicina serà més homogènia.

- a) Preparar 1 L de medi sòlid LB i esterilitzar. Deixar refredar fins a una temperatura de 50-65°C. Afegir estèrilment 2,5 ml d'una solució de rifampicina a 30 mg/ml. Agitar manualment i dispensar en plaques de Petri.
- b) La rifampicina es pot addicionar a les plaques de LB ja preparades. Per això, cal afegir a la placa una gota de 0,2 ml de solució salina estèril. Afegir immediatament a la gota 0,05 ml¹³ d'una solució de rifampicina a 30 mg/ml. Amb l'ajut d'una nansa de Digrafsky, estendre i repartir ràpidament la gota, de forma que es distribueixi per tota la placa. És fàcil comprovar si l'antibiòtic s'ha repartit de forma correcta ja que la rifampicina és de color taronja i per tant aquest color ha de quedar uniformement repartit per la placa.

Medi sòlid de Mueller-Hinton

- Preparar i esterilitzar el medi segons les indicacions del proveïdor.
- Dispensar 20 ml de medi per placa i conservar-les durant períodes curts a 4°C.
- Mantenir-les a temperatura ambient abans del seu ús un mínim de 30 min.

¹³ Volum per plaques de 20 ml de medi sòlid LB