

APÉNDICE E. PRUEBA DE SENSIBILIDAD POR DIFUSIÓN CON DISCOS (BAUER-KIRBY) [KONEMAN *ET AL*, 1999]

Medios y reactivos

1. Aislamiento bacteriano.
2. Caldo nutritivo (se recomienda caldo soya digerido de caseína) para el desarrollo del inóculo.
3. Estándar 0.5 de MacFarland para ajustar la turbidez del inóculo.
4. Agitador Vortex para la suspensión del inóculo.
5. Caja visora para la comparación del caldo con el estándar. Puede utilizarse un fotómetro si se documentan resultados satisfactorios.
6. Placas de agar Mueller-Hinton de 150 mm provenientes de un lote que produce resultados satisfactorios en el control de calidad. El pH debe ser de 7.2 a 7.4 y la profundidad del agar de aproximadamente 4 mm.
7. Calibres, regla o patrón para la medición de los diámetros de los halos de inhibición.

Procedimiento

a) Preparación del inóculo

1. Con un ansa metálica o con la punta de un hisopo de Dacron, tocar la superficie de cuatro o cinco colonias bien aisladas de aspecto similar en un cultivo en placas de agar. Se transfiere el crecimiento a un tubo de caldo que contiene 4 a 5 mL de un medio líquido apropiado.
2. Dejar que se desarrolle a 35°C hasta que la turbidez se equipare a la del estándar 0.5 McFarland. Agitar con energía el estándar en el Vortex inmediatamente antes de usar. Utilizar una luz adecuada para leer el tubo contra un fondo blanco con una línea negra de contraste. Si fuera necesario, agregar solución fisiológica estéril o caldo para obtener una turbidez comparable a la del estándar. En forma alternativa puede realizarse una suspensión directa en caldo o solución fisiológica de las

colonias de un cultivo de 18 a 24 horas en placa de agar, ajustada al estándar. En este caso, las bacterias deben haberse desarrollado en un medio nutritivo, no selectivo, como el agar sangre. Los dispositivos disponibles en el comercio para estandarizar el inóculo sin ajuste de la turbidez ni preincubación en medio líquido también han sido aceptables.

3. Dentro de los 15 minutos después de ajustar la turbidez de la suspensión del inóculo a la del estándar, sumergir un hisopo de algodón no tóxico, estéril, dentro de la suspensión del inóculo y rotarlo varias veces con una presión firme sobre las paredes laterales del tubo, para eliminar el exceso del líquido.
4. Sembrar la superficie seca de placas de agar de Mueller-Hinton que han sido llevadas a agar y rotar la placa aproximadamente 60°, para asegurarse de una distribución uniforme del inóculo en toda la superficie del agar. Colocar la tapa de la placa. Dejar de 3 a 5 minutos, pero no más de 15 minutos, para que se seque la superficie del agar antes de agregar los discos de antibióticos.

b) Preparación alternativa del inóculo

1. Realizar una suspensión directa en caldo o solución fisiológica de las colonias provenientes de un cultivo en placa de agar nutritivo, no selectivo, incubadas durante 18 a 24 horas.
2. Ajustar de inmediato el inóculo a la densidad del estándar, como se indicó previamente.
3. Este método se recomienda para las especies de *Haemophilus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae* y especies de *Staphylococcus*.

c) Prueba de antibióticos

1. Colocar los discos adecuados, impregnados en los agentes antimicrobianos sobre la superficie del agar, utilizando pinzas o aplicadores de multidiscos.
2. Presionar con suavidad cada disco sobre la superficie del agar, de manera que el contacto sea uniforme. No mover el disco una vez que se haya puesto en contacto

con el agar, debido a que parte del fármaco se difunde casi de inmediato. Los discos deben ser distribuidos de manera uniforme sobre el agar, de modo que la distancia centro a centro no sea menor de 24 mm.

3. Invertir las placas y colocarlas en una estufa de aire atmosférico a 35°C durante 16 a 18 horas.

Resultados

a) Interpretación

Medida de los diámetros de los halos: a pesar de que los halos de inhibición del crecimiento pueden aparecer temprano (4 horas después de la inoculación con algunas de las bacterias de crecimiento más rápido) y en consecuencia se hacen visibles poco después, el tiempo estándar en el cual se miden los diámetros de los halos es de 16 a 18 horas. Con el empleo de un calibre, regla o patrón se miden cuidadosamente los halos de inhibición completa del desarrollo alrededor de cada disco, al milímetro más próximo, incluyendo el diámetro del disco en esta medición.

Todas las mediciones se hacen a simple vista mientras se mira el fondo de la placa de Petri con luz emitida contra un fondo negro que no refleje. La línea de visión (vertical) debe ser exactamente perpendicular al plano de la placa, para evitar cualquier paralaje que pueda dar por resultado una lectura errónea. Las placas para determinaciones de susceptibilidad preparadas con sangre deben observarse desde la superficie del agar y las mediciones se harán sin la tapa, nuevamente con luz dirigida para iluminar la placa.