

## MODIFICACION DE LA TECNICA DE DISCOS ESTANDARIZADA DE KIRBY Y BAUER PARA PRUEBAS DE SENSIBILIDAD DEL ESTREPTOCOCO BETAHEMOLITICO DEL GRUPO A

HOSPITAL PEDIATRICO DOCENTE DE CENTRO HABANA

*Dr. Rafael Nodarse Hernández\**, *Dra. Daisy P. Rodríguez González\*\**, *Dr. Jorge L. Zuazo Silva\*\*\** y  
*Téc. María Suárez Cabrera\*\*\*\**

Nodarse Hernández, R. y otros: *Modificación de la técnica de discos estandarizada de Kirby y Bauer para pruebas de sensibilidad del estreptococo beta hemolítico del grupo A.*

Se introduce una modificación a la técnica de discos estandarizada de Kirby y Bauer para poder realizar pruebas de sensibilidad del estreptococo beta hemolítico del grupo A. Esta modificación consiste en tomar el tiempo de incubación de 4 horas como forma de estandarizar el inóculo y desechar el uso del patrón de turbiedad, dada la incapacidad de este microorganismo de producir la turbiedad necesaria dentro del tiempo establecido por estos autores para la realización de la prueba.

### INTRODUCCION

En 1966, *W. M. Kirby* y *A. W. Bauer* describen un método de difusión, usando una técnica de discos estandarizada para probar la sensibilidad de los microorganismos;<sup>1</sup> posteriormente esta técnica es recomendada por la OMS para su uso general.<sup>2</sup> Durante la realización de pruebas de sensibilidad con estreptococos beta hemolíticos del grupo A, motivadas por el papel patógeno tan importante que éstos tienen, fundamentalmente en niños,<sup>3,4</sup> se detectó que estos microorganismos muestran incapacidad para producir la turbiedad necesaria para ser comparada con un patrón de turbiedad como forma de estandarizar el inóculo. Se realizó una modificación que evita el uso del patrón, para poder llevar a cabo la prueba.

### DESCRIPCION Y COMENTARIOS

En la realización del método de difusión clásico se utiliza un patrón de turbiedad correspondiente al tubo 0,5 de la escala de Mc Farland para estandarizar el inóculo que se va

\* Médico Residente de 2do año en Microbiología. Hospital Pediátrico Docente de Centro Habana.

\*\* Especialista de I Grado en Microbiología. Investigadora Auxiliar del Departamento de Microbiología. Hospital Pediátrico Docente Centro Habana. Instructora del ICBP "Victoria de Girón".

\*\*\* Especialista de II Grado en Microbiología. Investigador Titular. Jefe del Departamento de Microbiología. Hospital Pediátrico Docente de Centro Habana. Profesor del ICBP "Victoria de Girón".

\*\*\*\* Técnica Auxiliar de Investigación del Departamento de Microbiología del Hospital Pediátrico Docente de Centro Habana.

a sembrar.<sup>5,6</sup> Esta turbiedad debe ser alcanzada en el tubo que contiene el cultivo en estudio, cuando el microorganismo se encuentra en la fase logarítmica o exponencial de su crecimiento y debe ocurrir dentro de las primeras horas de incubación,<sup>7,8</sup> que para los estreptococos se señala este período dentro de 4 a 8 horas.<sup>7,9,10</sup> Cuando se trató de realizar este método, se puso de manifiesto un fenómeno, al parecer no observado anteriormente por autores dedicados al estudio de la sensibilidad de los estreptococos, y que consiste en la incapacidad del estreptococo beta hemolítico del grupo A, en específico, de producir la turbiedad necesaria dentro de las primeras horas de incubación, para poder ser comparada con el patrón. Se analizaron diferentes variables para tratar de obtener la turbiedad necesaria. Estas variables fueron: carga del inóculo, tiempo de incubación, cantidad de caldo que se va a inocular y tipos de caldo.

Inicialmente se realiza una prueba utilizando la descripción del método clásico. Se tomaron 10 colonias de estreptococos beta hemolíticos del grupo A, a partir de una siembra en agar sangre; se inocularon en un tubo que contenía 10 ml de caldo triptosa y se incubaron por espacio de 4 horas a 37 °C. Contrariamente a lo que se esperaba, no se observó turbidez en el tubo, sólo elementos en suspensión.

Ante este fenómeno, decidimos aumentar la carga del inóculo, manteniendo igual cantidad del caldo y tiempo de incubación. Se tomaron 3 cargas: 20 colonias, 1 asada y el crecimiento obtenido en 1/4 de placa. Tampoco se logró obtener la turbiedad idónea con ninguna de las 3 cargas, observándose que sólo aumentaba de elementos en suspensión a mayor cantidad de inóculo usado. Se varía el tiempo de incubación, manteniendo la carga de inóculo inicial. Se probaron 3 tiempos diferentes: 4, 6 y 18 horas. Se observó que tanto a las 4 como a las 8 horas no se obtuvo turbiedad adecuada, a diferencia de 18 horas de incubación, donde sí apareció turbiedad franca mucho mayor que la presentada en el patrón de turbiedad. Como este tiempo de incubación es incompatible con los principios que rigen el método de difusión, se desechó la idea de tomarlo como tiempo de trabajo.

Se decidió variar la cantidad de caldo que se iba a inocular. Se inocularon tubos que contenían 5 ml, 4 ml, 3 ml y 2 ml, incubándose durante 4 horas. A pesar del cambio de volúmenes no se obtuvo turbiedad necesaria.

Se probaron diferentes tipos de caldos, para ver si la turbiedad dependía de que en alguno de ellos el germen crecía mejor que en los otros. Se utilizaron caldo triptosa, caldo corazón, caldo tripticasa y caldo Mueller-Hinton. No se observó turbiedad en ninguno, siempre y cuando fueran incubados en menos de las 8 horas recomendadas.

Comprobada la imposibilidad de llevar a cabo el método de Kirby y Bauer, tal y como se describe debido a la necesaria utilización del patrón de turbiedad como factor de estandarización y cuya obtención es imposible dentro del período de incubación indicado, nos vimos precisados a realizar una modificación para poder llevar a cabo el experimento, desechando el uso del patrón.

Como en los principios que fundamentan el método el microorganismo debe estar en la fase logarítmica o exponencial de su curva de crecimiento, se decidió realizar la curva correspondiente para el estreptococo del grupo A.

Para la obtención de la curva se tomó un crecimiento en caldo que fue incubado a 37 °C y al cual se le midió la turbiedad durante un período de 8 horas. Para esta lectura se utilizó un fotocolorímetro, cuya longitud de onda se estableció en 550 nm. La densi-

dad óptica fue medida cada 1 hora y los valores obtenidos se inscribieron en un gráfico, conformándose la curva (figura).

Del análisis de la curva se desprende que el valor medio aproximado en la sección correspondiente a la fase logarítmica era el de 4 horas, considerándose éste como el tiempo de incubación apropiado para la preparación de nuestro inóculo, que contenía  $10^6$  UFC/ml, valor también utilizado por Matsen.<sup>7</sup>

Basados en estas experiencias, se realizó la modificación del método de difusión descrito por Kirby y Bauer y se desechó el uso del patrón de turbiedad utilizando el tiempo de incubación de 4 horas,

en el cual el estreptococo se encuentra en la fase logarítmica, y en donde además, se consigue un crecimiento adecuado en la placa para poder desarrollar este método.

## CONCLUSIONES

Los estreptococos beta-hemolíticos del grupo A son incapaces de producir la turbiedad necesaria para ser comparada con el patrón 0,5 de Mc Farland, dentro de las primeras 8 horas de incubación, por lo que para la aplicación de la técnica de Kirby y Bauer en pruebas de sensibilidad se debe tomar el tiempo de incubación de 4 horas como el adecuado para que el germen esté en fase exponencial y su crecimiento sea útil.

## SUMMARY

Nodarse Hernández, R. et al.: *Modification to Bauer-Kirby standardized single disk method for susceptibility tests of Group A beta-hemolytic streptococcus.*

A modification to Bauer-Kirby standardized single disk method is introduced in order to perform susceptibility tests of Group A beta-hemolytic streptococcus. Such modification lies on taking an incubation time of 4 hours as way for the standardization of the inoculum and to reject the use of turbidity pattern, because of the incapacity of this microorganism for producing necessary turbidity within the time established by the authors for the performance of the test.

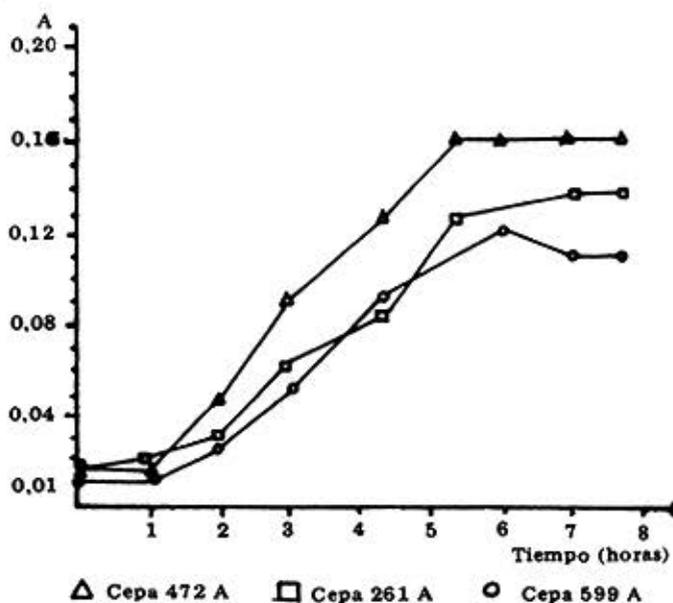


Figura. Curva de crecimiento del estreptococo beta-hemolítico grupo A. 1984.

## RÉSUMÉ

Nodarse Hernández, R. et al.: *Modification de la technique des disques standardisée de Kirby et Bauer pour des épreuves de sensibilité du streptocoque bêta-hémolytique du groupe A.*

Les auteurs font une modification à la technique des disques standardisée de Kirby et Bauer pour pouvoir réaliser des épreuves de sensibilité du streptocoque bêta-hémolytique du groupe A. Elle consiste en la prise du temps d'incubation de 4 heures comme une forme pour standardiser l'inoculum et en rejeter l'emploi du pattern de turbidité, étant donné l'incapacité de ce microorganisme de produire la turbidité nécessaire pendant le temps établi par ces auteurs pour la réalisation de l'épreuve.

## BIBLIOGRAFIA

1. *Bauer, A. W.; W. M. Kirby: Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol 45 (4): 493-496, 1966.*
2. *Organización Mundial de la Salud: 28º Informe del Comité de Expertos en Patología Biológica. Serie de informes técnicos, No. 610, Ginebra, 1977.*
3. *Jawetz, E. et al.: Manual de Microbiología Médica. 9na ed. México, Ed. El Manual Moderno. 1982. Pp. 189-192.*
4. *Joklik, W. K. et al.: Zinsser Microbiología. 17ma ed. Cuba Ed. Revolucionaria, Cuba, 1983. P. 531.*
5. *Barry, A. L. et al.: The amount of agar in antimicrobial disk susceptibility test plates. Am J Clin Pathol 59 (2): 196-198, 1973.*
6. *Wolf, P. L. et al.: Practical Clinical Microbiology and Mycology: Techniques and Interpretations. A Nalley Biomedical Health Publications. USA, 1975. Pp. 238-264.*
7. *Matsen, J. M.; C. R. Coglán: Antibiotic Testing and Susceptibility Patterns of Streptococci (chapter 12). In: Streptococcal Diseases. USA, Academic Press Inc 1972. Pp. 189-197.*
8. *Barry, A. L.; C. Thomsberry: Susceptibility Testing: Diffusion Test Procedures. Manual Clin Microbiol. 3ra ed. Pp. 463-474. Am Soc for Microb USA, 1980.*
9. *Matsen, J. M. et al.: Evaluation of the Bauer-Kirby-Sherris-Turk single-disk diffusion method of antibiotic susceptibility testing. Antim Ag Chem 1969: 44-453, 1970.*
10. *Matsen, J. M. et al.: In vitro susceptibility patterns of beta-hemolytic streptococci. Anting Ag Chem 1969: 485-488, 1970.*

Recibido: 28 de marzo de 1986. Aprobado: 12 de mayo de 1986.

Dr. *Rafael Nodarse Hernández*. Hospital Pediátrico Docente de Centro Habana. Morales y Benjumeda, Cerro, zona postal 6, Ciudad de La Habana, Cuba.