

UN MÉTODO SIMPLE PARA LA MEDIDA DE HALOS DE DIFUSIÓN EN CULTIVOS BIOLÓGICOS

C. Manzano¹, A. Landa¹, D. Calva¹ y M. Lehman²

¹ Software Integral para Laboratorio (Sofilab) S. A. de C. V.

Lisboa 14-A, Col. Juárez, Del. Cuahutémoc, México DF

+52-5566-5472 ext. 104, +52-5566-5196, dcalva@ienlaces.com.mx

² Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica (INAOE)

L. E. Erro 1, Tonantzintla, Puebla (México)

Tel.: +52-2247-2011 ext. 8113, Fax: +52-2247-2940, email: mlehman@inaoep.mx

Resumen: Se describe un equipo construido para la medición automática de diámetros de halos de inhibición que se forma en el tratamiento de muestras (colocadas en cajas Petri) con antibióticos. Se emplean componentes de bajo costo, pero considerando una adecuada eficiencia de medición, a través de la toma de imágenes de los cultivos, que se encuentran dentro de un recipiente aislado (tipo incubadora). Las ventajas de este método respecto a otros conocidos y los posibles futuros desarrollos en esta área también son analizados.

INTRODUCCIÓN

El método de medición mediante la zona de difusión, para la presencia de bacterias en diferentes medios (saliva, orina, sangre, etc.), empleando discos de antibióticos es el más antiguo conocido [1,2]. Este método ha sido y continúa siendo una técnica ampliamente usada en los laboratorios para evaluar la sensibilidad de bacterias a diferentes tipos de antibióticos.

Con el correr de los años, diversos estudios han permitido depurar el proceso y hacerlo más determinístico en cuanto a la concentración y su relación con el diámetro de los halos que se forman alrededor de los discos. Actualmente, muchos laboratorios que emplean este procedimiento miden estos halos de difusión mediante una simple inspección visual con ayuda de una escala graduada.

Es de esperar que las mediciones en este sentido puedan ser mejoradas si se emplean métodos más precisos que permitan no solo dar un mejor resultado en los laboratorios dedicados al análisis de muestras, sino también para la mejora misma de este método mediante la investigación en diferentes aspectos de la microbiología [3-5].

En este sentido, varios nuevos productos han aparecido en el mercado para una mejor medición de los diámetros de halos [6]. La estructura básica de dichos dispositivos utiliza una cámara digital y un sencillo software de procesamiento, aunque también las aplicaciones han sido orientadas en otras direcciones como conteo de colonias, discriminación a través de colores, etc.

En este trabajo se implementa un método diferente de los que pueden encontrarse en el mercado, para medir el diámetro del halo de inhibición que se forma en la reacción entre un cultivo biológico y diferentes tipos de antibióticos. Estos pueden ser colocados mediante discos individuales o bien multidiscos sobre la muestra. Para esto, se armó un equipo controlado por computadora, que mantiene las muestras a una temperatura de 37°C. Al ser este un sistema integrado, mostramos cuáles son sus ventajas respecto a otros dispositivos y también las posibles aplicaciones, junto con los futuros desarrollos.

FUNDAMENTOS BÁSICOS

La difusión (D) de un antibiótico en un medio como el que tratamos aquí, obedece la ley de Fick, modificada posteriormente por otros autores [7]:

$$X^2 = 4Dt \ln\left(\frac{m_0}{m}\right) \quad (1)$$

siendo X la distancia de progresión del antibiótico en el disco, D la constante de difusión del antibiótico, t el tiempo de observación, m_0 la concentración del antibiótico en la fuente y m la concentración crítica, que varía con la sensibilidad de las bacterias estudiadas.

Después de un tiempo que oscila entre 18 y 24 horas se forman los halos de inhibición alrededor de los discos, que pueden reconocerse porque son zonas

más claras dentro de la muestra. Una simulación de este efecto puede observarse en la Figura 1, donde los discos de antibióticos son de color negro y alrededor de ellos está dicha zona de inhibición. La imagen total es circular porque se supone que el cultivo se realizó dentro de una caja Petri. Estas son de plástico transparente con diámetro variable, aunque las más utilizadas tienen alrededor de 12cm de diámetro, y una altura de alrededor de 1cm.

Existe una relación directa entre el diámetro de dicho halo que se forma alrededor del disco y la concentración de las bacterias, que en general se puede clasificar como baja, media y alta [7]. Esto es muy importante para el diagnóstico que el laboratorio pueda dar de la muestra y, en el caso médico poder señalar el camino a seguir en la cura del paciente.



Figura 1. Simulación de la formación de halos de inhibición en una muestra.

RESULTADOS OBTENIDOS Y DISCUSIÓN

Para la medición se implementó el equipo que se muestra en la Figura 2. El control general lo realiza la computadora. El controlador de movimientos es la consola que activa los servomotores de posicionamiento (se emplearon servomotores MD-2 de Arrick Robotics con 400 pasos por vuelta). Con este sistema, la computadora activa por sí sola el sistema de medición una vez que haya transcurrido el tiempo deseado por el usuario. Ejerce además un control sobre la temperatura mediante una conexión al pirómetro. Entonces, se puede contar con un registro de temperatura a lo largo del tiempo para aplicaciones más sofisticadas. El recipiente de cultivo

y medición es similar a un calorímetro y hace las veces de incubadora. Allí están alojadas las muestras y en su interior serán tomadas las imágenes de cada una de las cajas Petri.

La medición del diámetro del halo se realiza a través de la imagen registrada por una cámara CCD (que corresponde a la sigla en inglés Charge Coupled Device), y no es más que un arreglo matricial de fotodiodos de alrededor de 10 μ m de lado. Para implementar un método de bajo costo, utilizamos una cámara de video conferencia, con una entrada TWAIN (no tiene un significado preciso en inglés, pero el más aceptado es Technology Without An Interesting Name), que consiste en un estándar de direccionadores para emplear una única entrada para todos los periféricos (scanners, cámaras de video conferencia, impresoras, etc.). Este dispositivo incluido en la PC nos evita el empleo de una tarjeta de adquisición y reduce bastante el costo del equipo. También se desarrolló el software correspondiente que permite controlar los diferentes parámetros, empleando lenguaje C y Visual Basic. El sistema dentro del recipiente principal se muestra en la Figura 3. Se pueden colocar varias cajas Petri dentro de un plato que luego será rotado mecánicamente mediante los servomotores y las imágenes de las cajas de Petri serán almacenadas en la computadora para una posterior determinación de los diámetros de halos. La ventaja de este equipo es que la muestra no necesita sacarse de la incubadora para efectuar la medición, además de su bajo costo al ser un sistema integrado y la posibilidad de dejar muestras preparadas cuyo halo de inhibición será medido automáticamente luego de un tiempo fijado por el usuario.

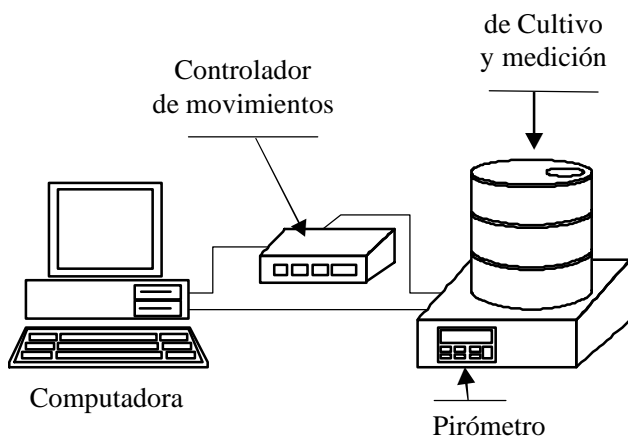


Figura 2. Equipo completo empleado para la medición de los halos de inhibición.

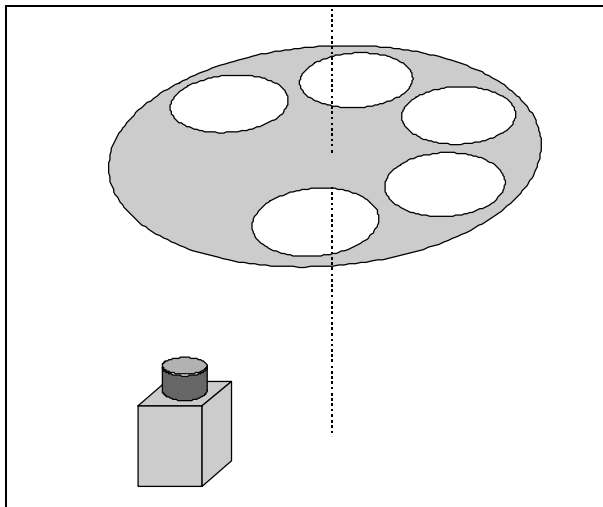


Figura 3. Plato conteniendo las cajas Petri y cámara CCD debajo de ella para la toma de las imágenes.



Figura 4. Parte de la imagen de una muestra en una caja Petri. Se pueden ver los discos con sus códigos.

En la Figura 4 puede verse una imagen típica de los discos con su correspondiente halo de inhibición. Como ya hemos dicho, la computadora se encarga de activar todo el mecanismo y medir el diámetro luego de cierto tiempo. Esto representa una gran

ventaja para los laboratorios mexicanos, ya que las muestras se preparan actualmente entre lunes y jueves (pues requieren 24 horas de incubación). Mediante este método podrán prepararse incluso el día sábado por la mañana.

Varias otras aplicaciones, como conteo de colonias y diferenciación a través del color pueden ser tomadas en cuenta. En la Figura 5 se muestra este tipo de cultivo donde se requiere de un conteo.

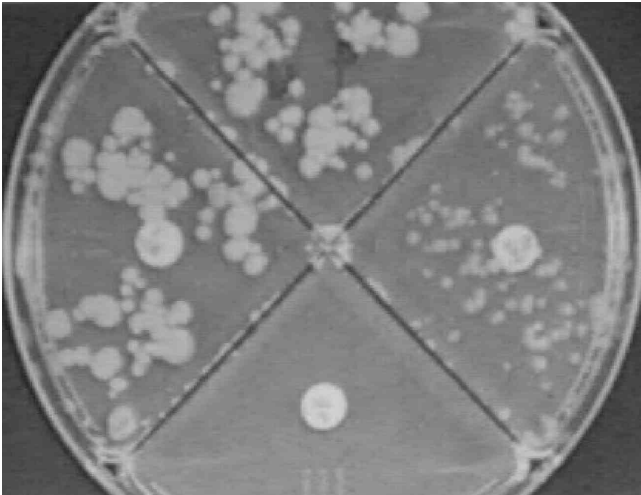


Figura 5 Cultivo de bacterias y desarrollo de diferentes colonias en una caja Petri de cuatro cuadrantes.

Aunque el método de captura en sí ha sido totalmente automatizado mediante este dispositivo, quedan dos instancias por automatizar: 1) la preparación de la muestra y 2) la determinación del código de antibiótico. En el primer caso, existen algunos métodos que posibilitan y ayudan en gran medida a ese proceso. En el segundo caso, queda para una etapa posterior que será desarrollada durante el presente año, mediante la utilización de métodos de reconocimiento de caracteres (para los códigos de los discos de antibióticos), y entonces permitirán arrojar directamente los resultados y no requerirán de una inspección visual de las imágenes por parte de los usuarios. Esto también significará un ahorro en la memoria de la computadora, ya que sólo arrojará el resultado final.

CONCLUSIONES Y FUTUROS DESARROLLOS

Se ha desarrollado un nuevo método integral de análisis en halos de inhibición, con varias ventajas

sobre otros que ya han aparecido en el mercado. Entre estas ventajas podemos mencionar:

- 1) Se elimina la subjetividad ya que en muchos laboratorios esta medición se realiza con una regla.
- 2) Se eliminan los errores aleatorios que se introducen al medir de esta forma.
- 3) La muestra permanece en todo momento aislada y no debe sacarse de la incubación para hacer la medición.
- 4) Permite la preparación de muestras durante toda la semana, ya que la computadora mide automáticamente luego de 24 horas (o luego del tiempo que desee el usuario).
- 5) El sistema posibilita regular todos los parámetros de incubación y medición, de modo que puedan obtenerse resultados para otro tipo de estudio con la misma metodología.
- 6) Es un equipo de muy bajo costo al emplear sistemas sencillos y de nueva tecnología, como la cámara de video conferencia y la entrada TWAIN.

Sin embargo, quedan algunos aspectos por mejorar en el proceso y en un futuro se prevé el reconocimiento de los códigos de discos individuales mediante la imagen adquirida. Esto automatizará el sistema en un mayor nivel.

Creemos que el equipo está preparado también para ser utilizado en el control de diversos procesos derivados de la industria de la biotecnología, incluso para investigación en biomedicina.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se desarrolló con fondos propios de la compañía Sofilab S. A. de C. V., a través del proyecto

NeuroSofilab. Hechos los depósitos de derechos de autor del software y patente del equipo en trámite.

REFERENCIAS

- [1] E. W. Koneman, S. D. Allen, V. R. Dowell, H. M. Sommers, Diagnostico microbiologico, Editorial Medica Panamericana, Traducccion efectuada por Dra. Aida victoria Wasserman, México D.F. (1985).
- [2] J. Deacon, The Microbial World, 1999, <http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/microbes.htm#top>, fecha de última consulta: 13/2/01.
- [3] P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, Manual of Clinical Microbiology, American Society for Microbiology, 7th edition (1999)
- [4] J. A. Morello, H. E. Mizer, M. E. Wilson, Microbiology in Patient Care, Granato McGraw-Hill, 6th edicion (1998).
- [5] R. M. Maier (Editor), I. L. Pepper (Editor), C. P. Gerba (Editor), Environmental Microbiology, Academic Press (2000).
- [6] Synoptics Ltd., 1999, <http://www.synoptics.co.uk>, fecha de última consulta: 10/2/01
- [7] C. Poyart-Salmeron and P. Courvalin, The disc-agar diffusion test: a technique which remain usefull, Section Bacteriology in Diagnostic Pasteur (Tech. Report,) 1985, pp. 3-11.