

# Pruebas de Sensibilidad a los Antimicrobianos

(Antibiograma por difusión con discos - CIM/CBM –  
Curvas de muerte - PIS/PBS- VBS – Dosaje de Antimicrobianos)



*Mirta G. Quinteros*

# ANTIMICROBIANOS (ATM)

Sustancias capaces de inhibir el crecimiento e incluso destruir determinadas especies microbianas de forma específica, a bajas concentraciones y sin toxicidad, o muy baja, para el organismo humano.

Estos compuestos pueden estar producidos por microorganismos vivos (antibióticos) o por síntesis química (quimioterápicos).



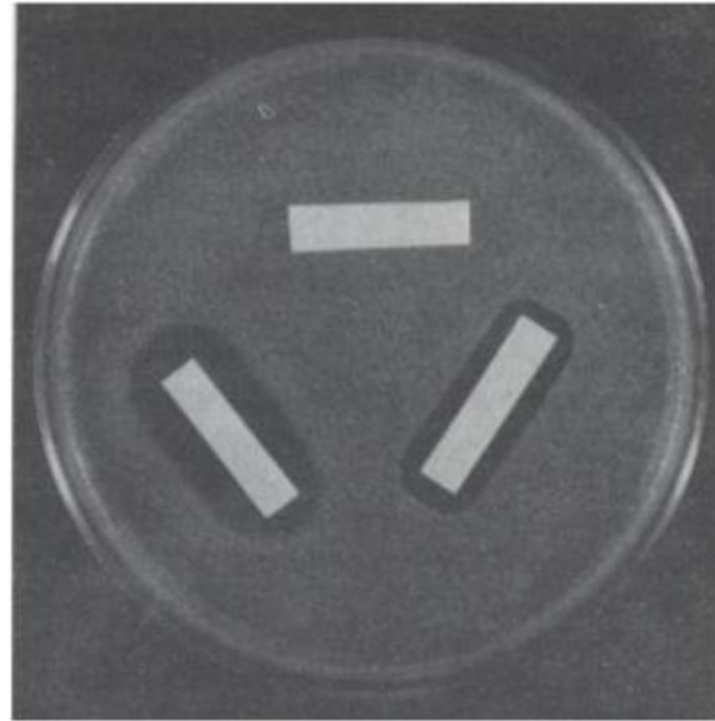
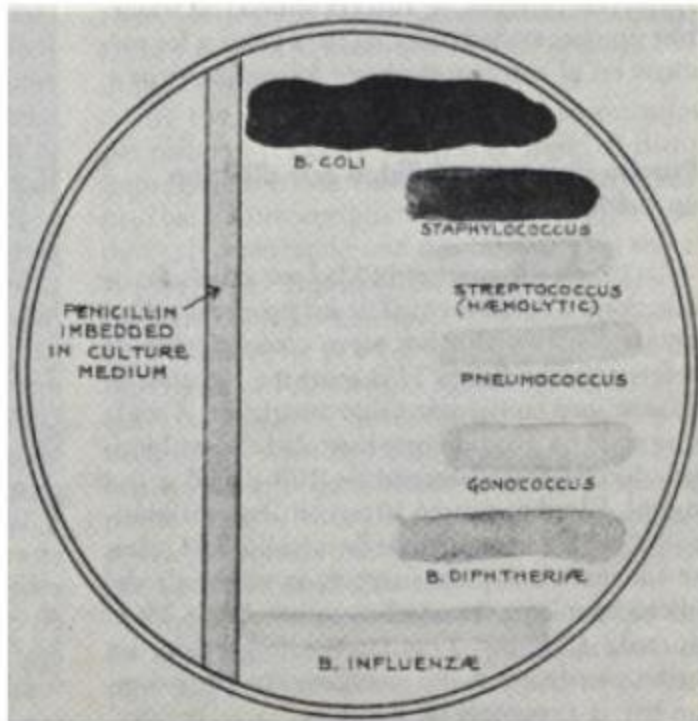
Fig. 1.- Fleming y la penicilina. En 1928, realizaba varios experimentos en su laboratorio, y el día 22 cuando observaba sus cultivos antes de descartarlos, notó que la colonia de un hongo había crecido espontáneamente, como contaminante en una de las Placas de Petri sembradas con *Staphylococcus aureus*. Fleming observó más tarde las placas y comprobó que las colonias bacterianas que se encontraban alrededor del hongo (más tarde identificado como *Penicillium notatum*) eran transparentes debido a una lisis bacteriana. *Penicillium* produce penicilina, la cual posee efectos antibacterianos.



# ANTIBIÓTICOS vs RESISTENCIA

Un poco de historia...

Realizada por Fleming



# ANTIBIÓTICOS vs RESISTENCIA

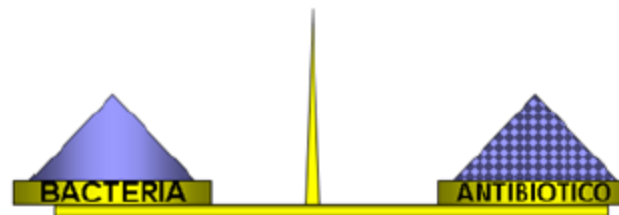
## RESISTENCIA

La resistencia bacteriana es la capacidad que tiene la bacteria de sobrevivir en presencia de un antibiótico y representa una ventaja que posibilita su proliferación, ya sea en nosocomios o el ambiente

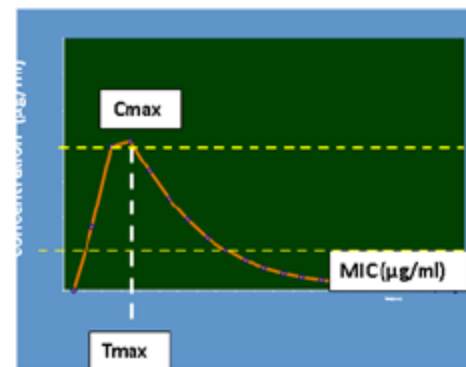
# ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

## Antibiograma: predicción clínica

Situación estática:  
inóculo fijo  
Concentración fija



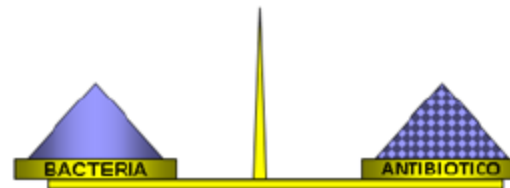
Situación dinámica:  
Multiplicación en tejidos  
Farmacocinética



# ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

## Antibiograma

- Método:
  - Difusión en disco
  - Dilución: agar, caldo, e-test
- Condiciones estándar
  - Inóculo (carga del microorganismo)
  - Medio de cultivo
  - Concentración del antimicrobiano
  - Condiciones de incubación (tiempo)



# Concentración Inhibitoria Mínima

Se define como la menor cantidad de antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento de un microorganismo y generalmente se expresa en  $\mu\text{g}/\text{mL}$

## **Concentración Bactericida Mínima**

**Se define como la menor concentración del antimicrobiano capaz de matar al 99,9 % del inóculo original.**



# Concentraciones

## Puntos de corte

### Puntos de corte

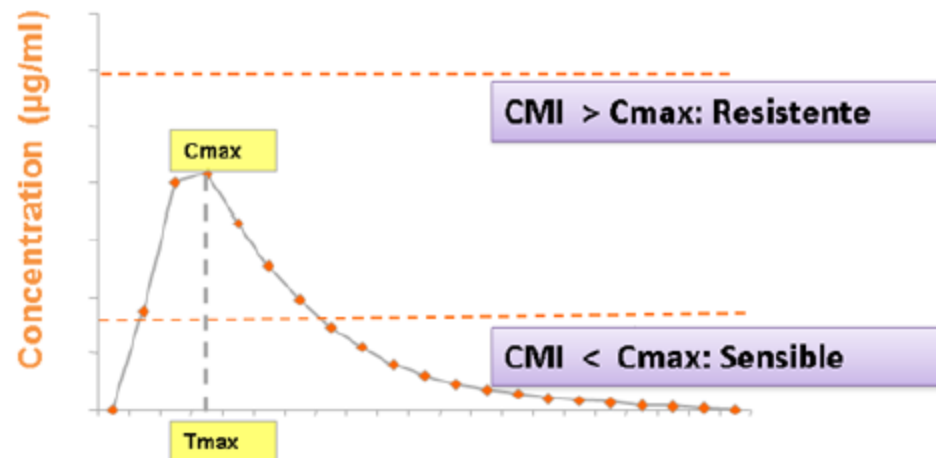
- Permiten establecer criterios de interpretación del estudio de susceptibilidad en relación a categorías: susceptible, intermedio, resistente.
- Existen tres tipos de puntos de corte:



# Concentraciones Puntos de corte

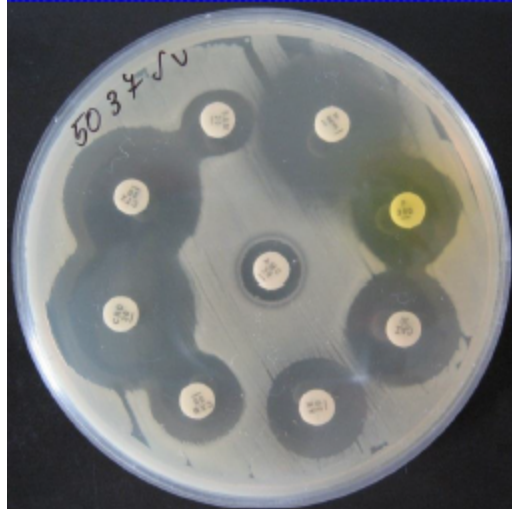
## Criterio farmacológico

- Correlaciona el resultado de la CMI con la concentración que se alcanza en el lugar de la infección



# Antibiograma

Estudio *in vitro* de la actividad de los antimicrobianos frente a los microorganismos.



## OBJETIVOS

ESTABLECER PLANES TERAPÉUTICOS INDIVIDUALES

EPIDEMIOLÓGICO: EVOLUCIÓN DE LAS RESISTENCIAS

RESULTADO PREDICTIVO DE EFICACIA CLÍNICA

INFORMACIÓN PARA TRATAMIENTO EMPÍRICO

# Pruebas de Sensibilidad a los Antimicrobianos

## a) Aportes desde la sensibilidad

- Influyen decisiones sobre el tratamiento específico individual.
- Orientan tratamiento empírico inicial
- Desarrollo del vademecum hospitalario.
- Estudio de la actividad de nuevos agentes antimicrobianos.

# Pruebas de Sensibilidad a los Antimicrobianos

## b) Aportes desde la resistencia

- Resistencias intrínseca: una herramienta útil en la identificación bacteriana.
- Vigilancia de patrones de resistencia ATB en microorganismos patógenos nosocomiales o no, para detectar *emergencia de resistencia*
- Aplicación de políticas de control de infecciones.

# Estudio laboratorio de la resistencia a antibióticos

- ¿Cuáles son los métodos disponibles para probar la sensibilidad a los antibióticos?

## Métodos de difusión

- Difusión en disco
- E-Test

## Otros métodos

- Métodos moleculares
- Métodos automatizados

## Métodos de dilución

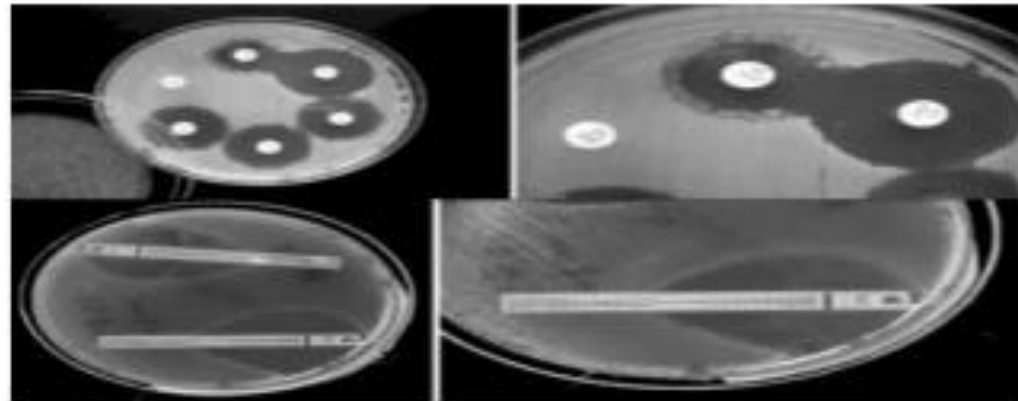
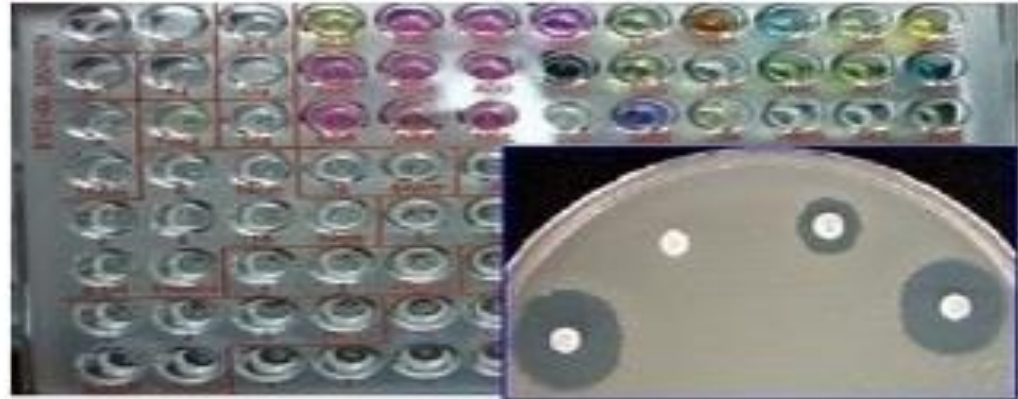
- Macro dilución en caldo
- Micro dilución en caldo
- Dilución en medio sólido con agar





➤ Pruebas de sensibilidad bacteriana in vitro:

- Método base de dilución en caldo.
- **Método de difusión en agar.**
- **Método de E-test**
- **Métodos automatizados**

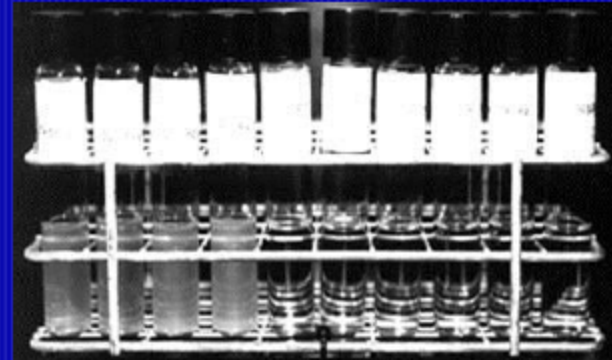


# Métodos cuantitativos

## Dilución en caldo

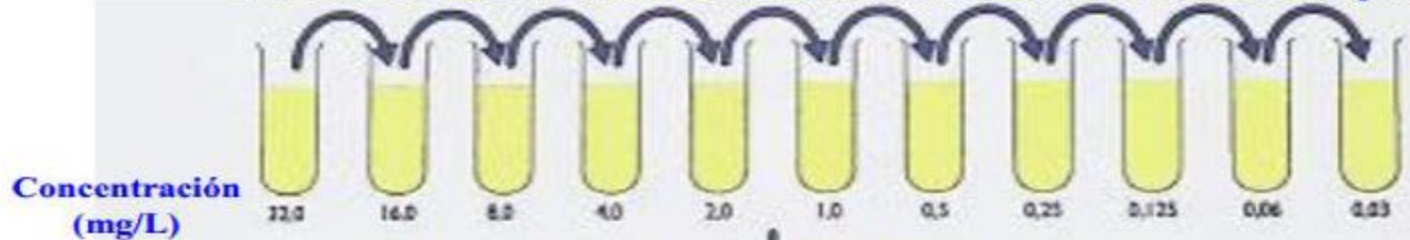
**FUNDAMENTO:** Se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar).

- **Más exacto**
- **Mayor valor clínico**
- **CIM - CBM**
- **Técnica compleja**
- **Costoso**
- **De referencia**
- **Se realiza cuando no se observa buena evolución clínica**
- **ATB tóxicos para ajustar la dosis**

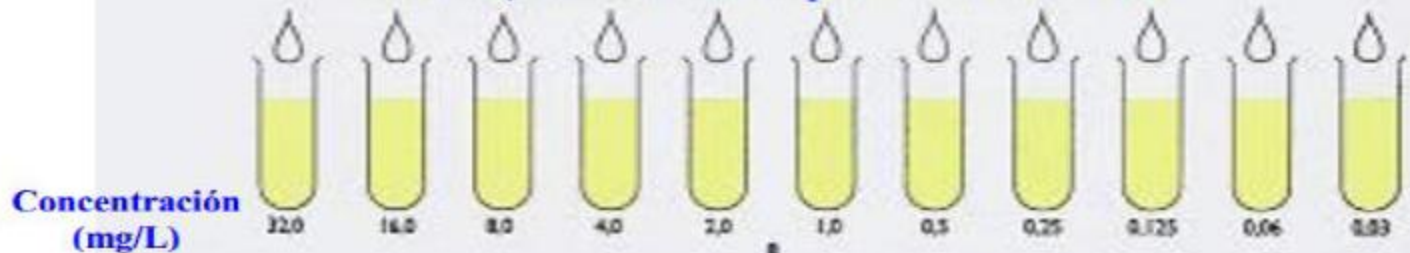


# Macrodilución en caldo

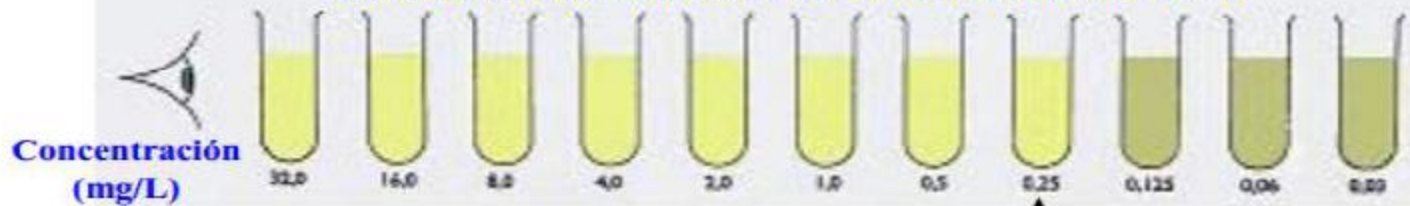
Efectuar diluciones dobles del antibiótico en un medio de crecimiento líquido



Añadir una concentración ↓ baja (aproximadamente 10.000/ml) de las colonias de prueba a cada dilución

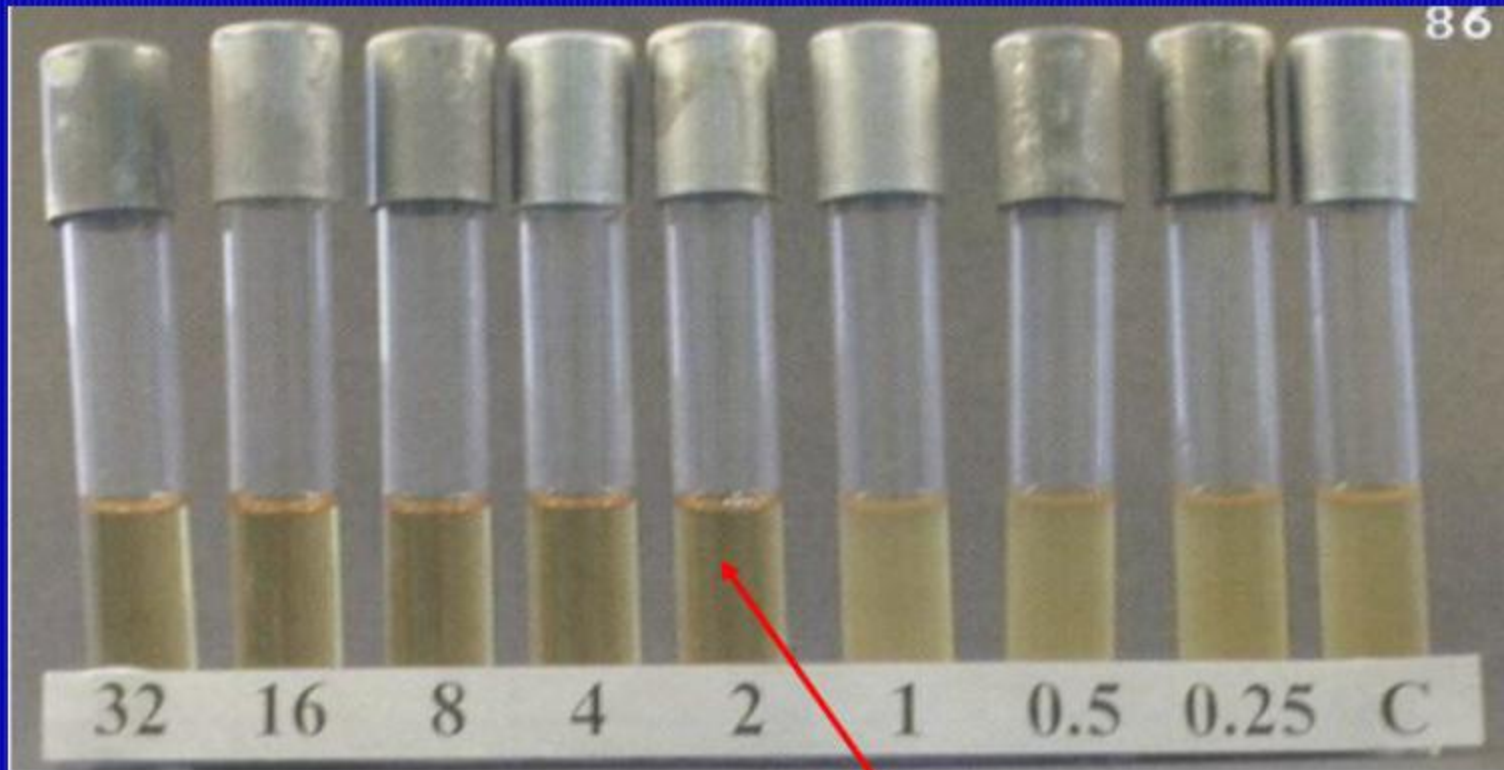


Observar el crecimiento tras 18-24 h de incubación a 37 °C



CMI = 0,25 mg/L

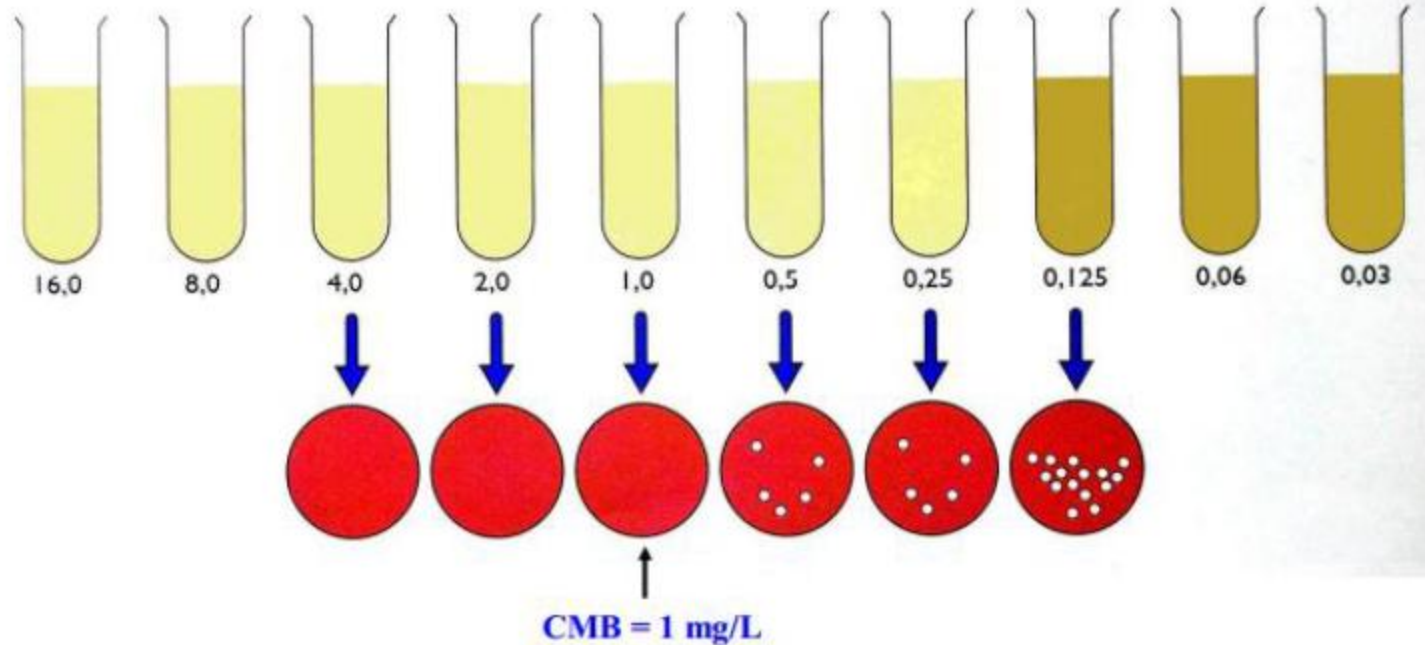
# Macrodilución en caldo



CMI = 2 mg/L



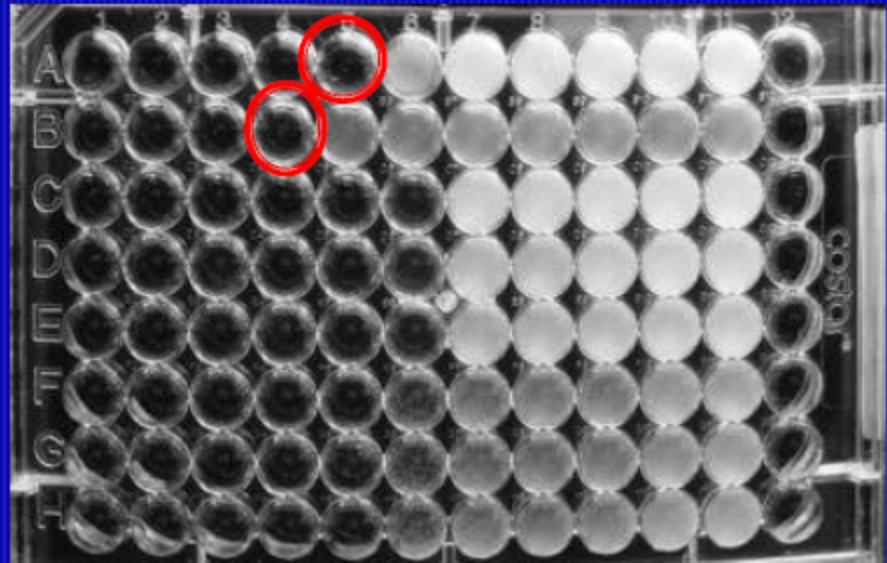
# Macrodilución en caldo



# Microdilución en caldo

FUNDAMENTO: Cada uno de los pocillos de fondo en «U» de la placa representa uno de los tubos del método de macrodilución.

- 10-12 antibióticos diferentes
- Más microorganismos a menos antibióticos
- Pipetas multicanal
- Lectura automatizada
- Resultados en 4 horas

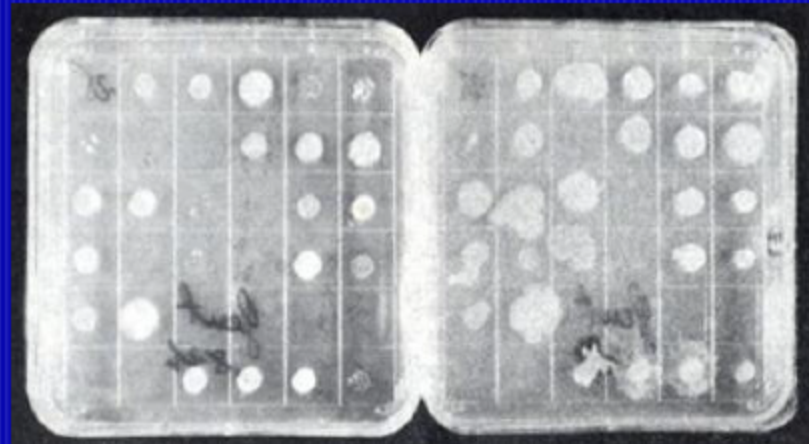




# Técnica Dilución en agar

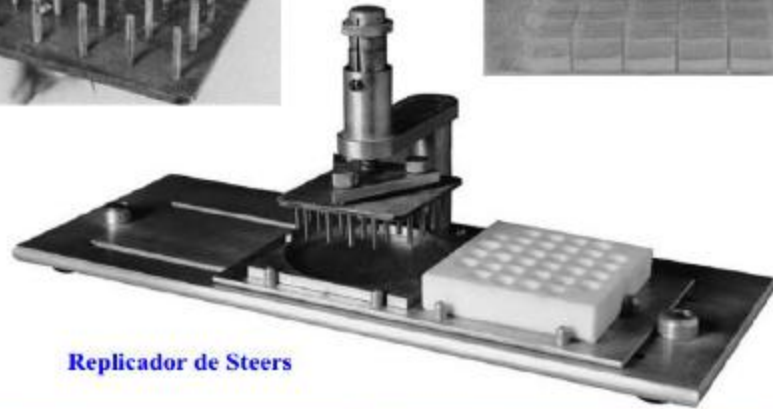
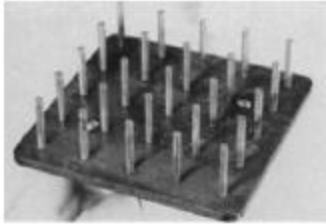
**FUNDAMENTO:** Variante de la dilución en caldo. Se prepara una placa para cada concentración decreciente de ATB selectivo. Los microorganismos se desarrollarán en las placas que no contengan cantidad de ATB suficiente para inhibirlos.

- 32-36 microorganismos
- CMI
- Placas comerciales
- Laboriosa, costosa
- Automatización
- Adecuada para laboratorios con gran volúmen de trabajo
- Asociaciones de ATB



# Técnica Dilución en agar

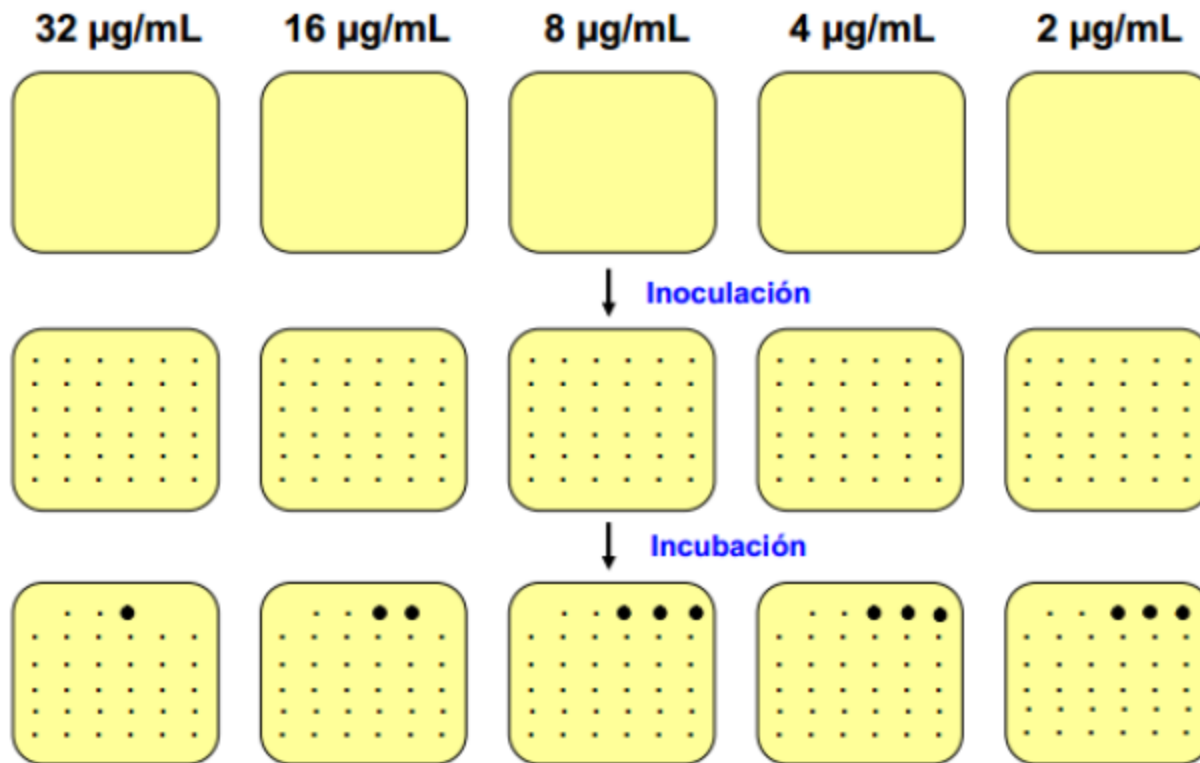
Replicador manual



Replicador de Steers



# Técnica Dilución en agar



Lectura

# Test Épsilon

## E-test

**FUNDAMENTO:** Variante del método de difusión en agar , con la ventaja de ser cuantitativo. Utiliza una tira con un gradiente exponencial de un ATB y por lectura directa determina la CIM.

- E-test (tiras patentadas, AB Biodisk, Suecia)
- Gradiente logarítmico de concentración
- Zona de inhibición elipsoidal (no circular)
- Valor de la CMI en la escala
- Método cómodo, pero caro

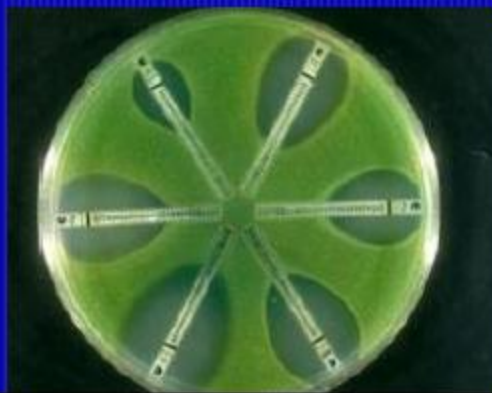
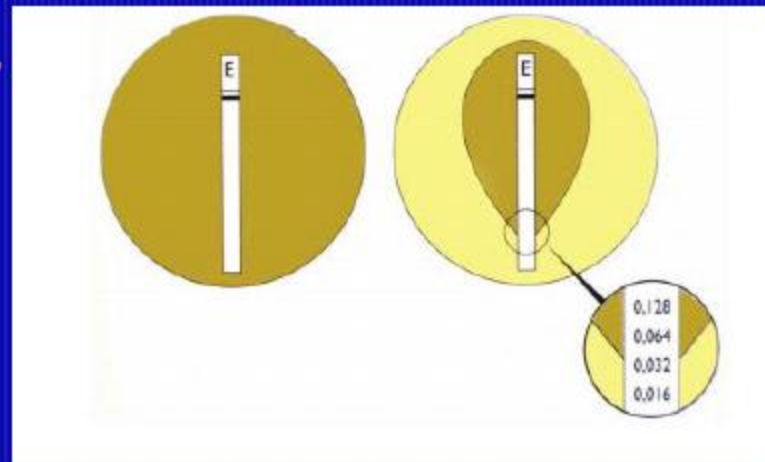




# Test Épsilon

## E-test

- E-test (tiras patentadas, AB Biodisk, Suecia)
- Gradiente logarítmico de concentración
- Zona de inhibición elipsoidal (no circular)
- Valor de la CMI en la escala
- Método cómodo, pero caro, no para uso rutinario

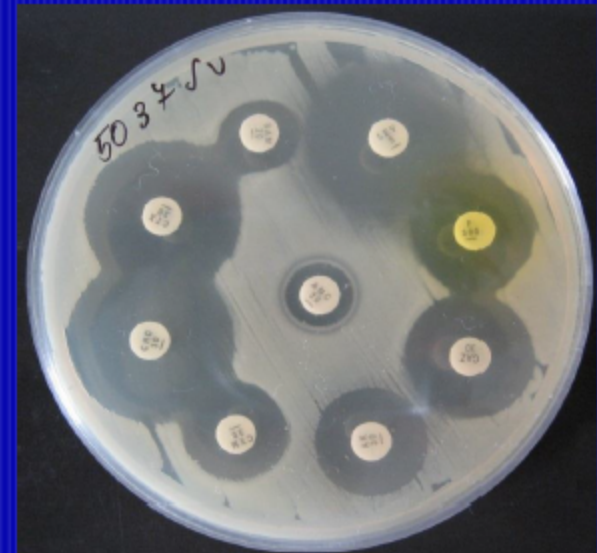


# Método cualitativo: difusión en agar

## Prueba de Bauer-Kirby

FUNDAMENTO: Está basada en la correlación existente entre el diámetro de los halos de inhibición y la respuesta in vivo. Esta correlación está estudiada para los antibióticos más comunes y los principales agentes bacterianos y puede ser consultada en diferentes institutos y sociedades ( MENSURA, EUCAST, CLSI).

- **No tan exacto**
- **Resultados cualitativos**
- **No da información sobre CIM**
- **Técnica sencilla y práctica**
- **Satisfactoria relación con clínica**
- **Menos costoso**





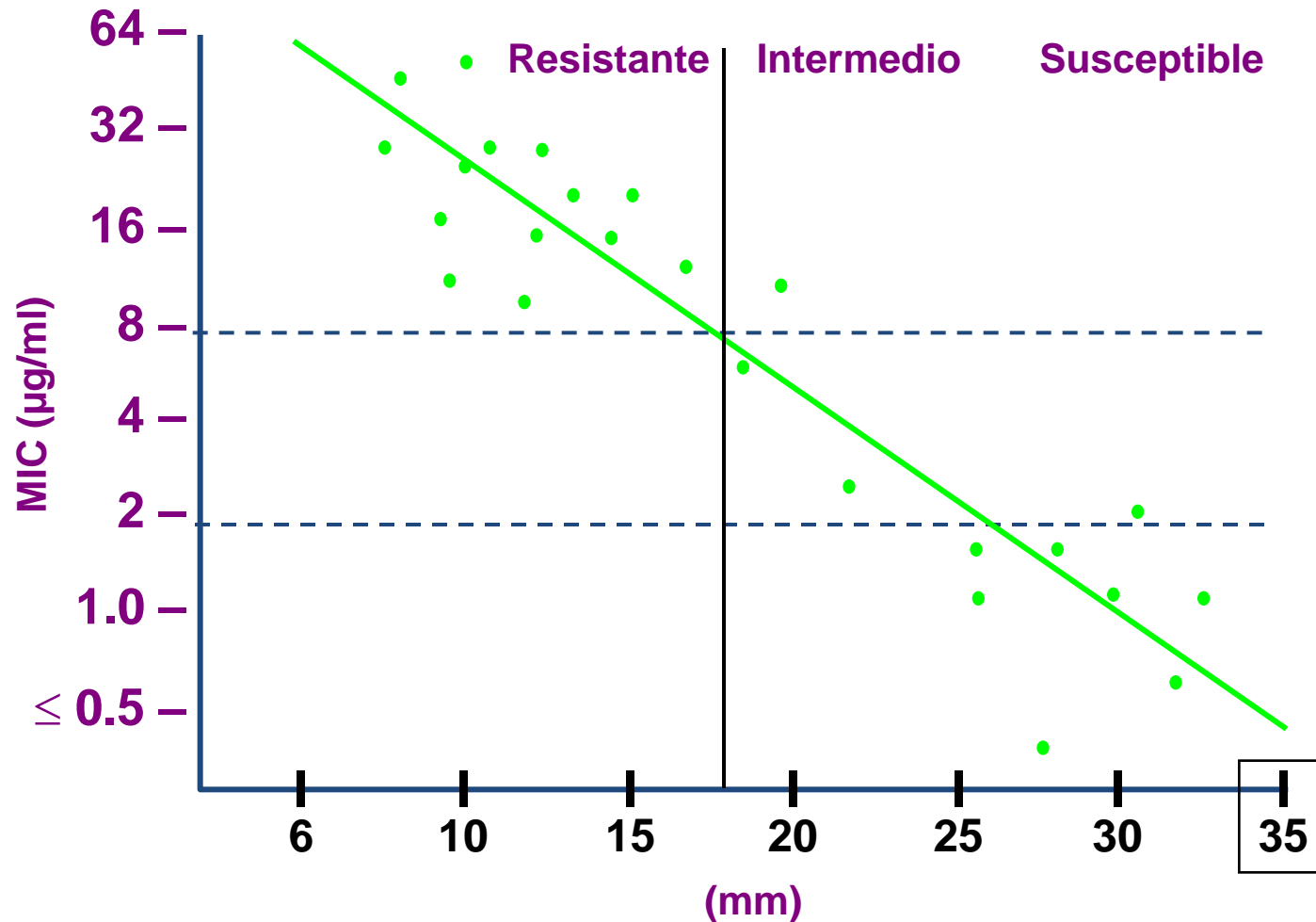
# Pruebas de Sensibilidad a los Antimicrobianos

## INTERPRETACIÓN E INFORME

- Los halos de sensibilidad medidos en mm, se interpretan de acuerdo a las Normas del CLS o EUCAST, que nos permiten determinar si esa bacteria es sensible o no a determinado antimicrobiano ensayado.
- Los puntos de corte serán establecidos en las curvas de correlación, entre la CIM (ug/ml) y los mm de halo de inhibición observado en la prueba de difusión en agar con discos, de una determinada bacteria frente al antimicrobiano ensayado.

# Pruebas de Sensibilidad a los Antimicrobianos

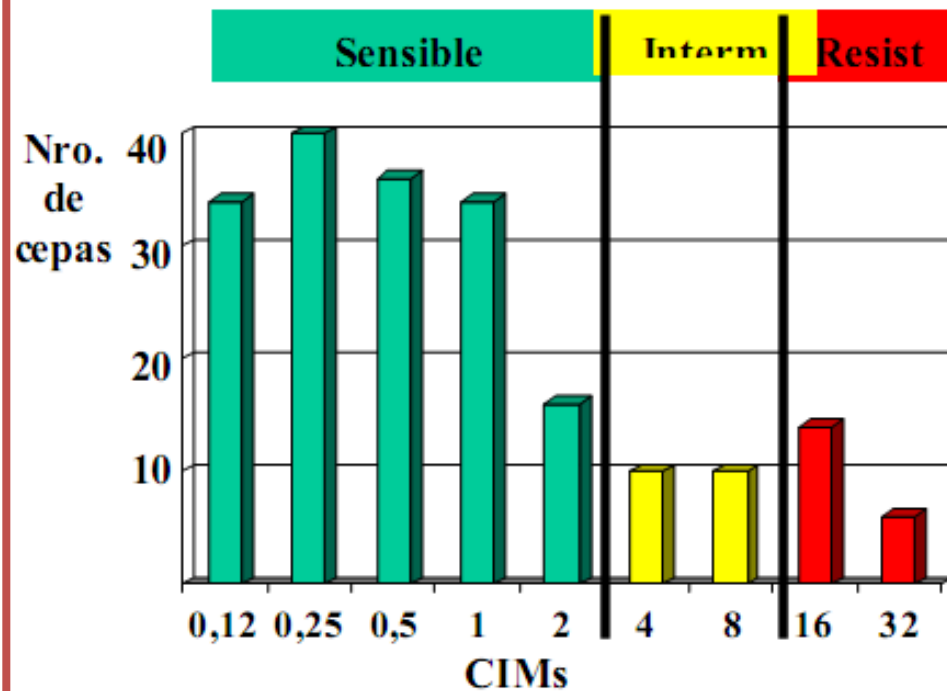
## INTERPRETACIÓN E INFORME



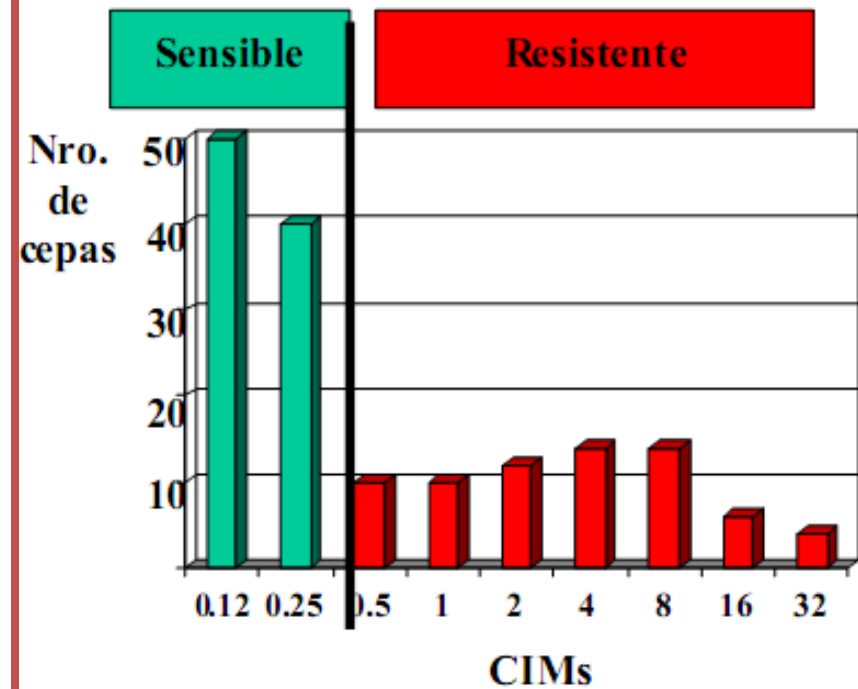
# Pruebas de Sensibilidad a los Antimicrobianos

HISTOGRAMAS: Distribución de microorganismos Vs CIM

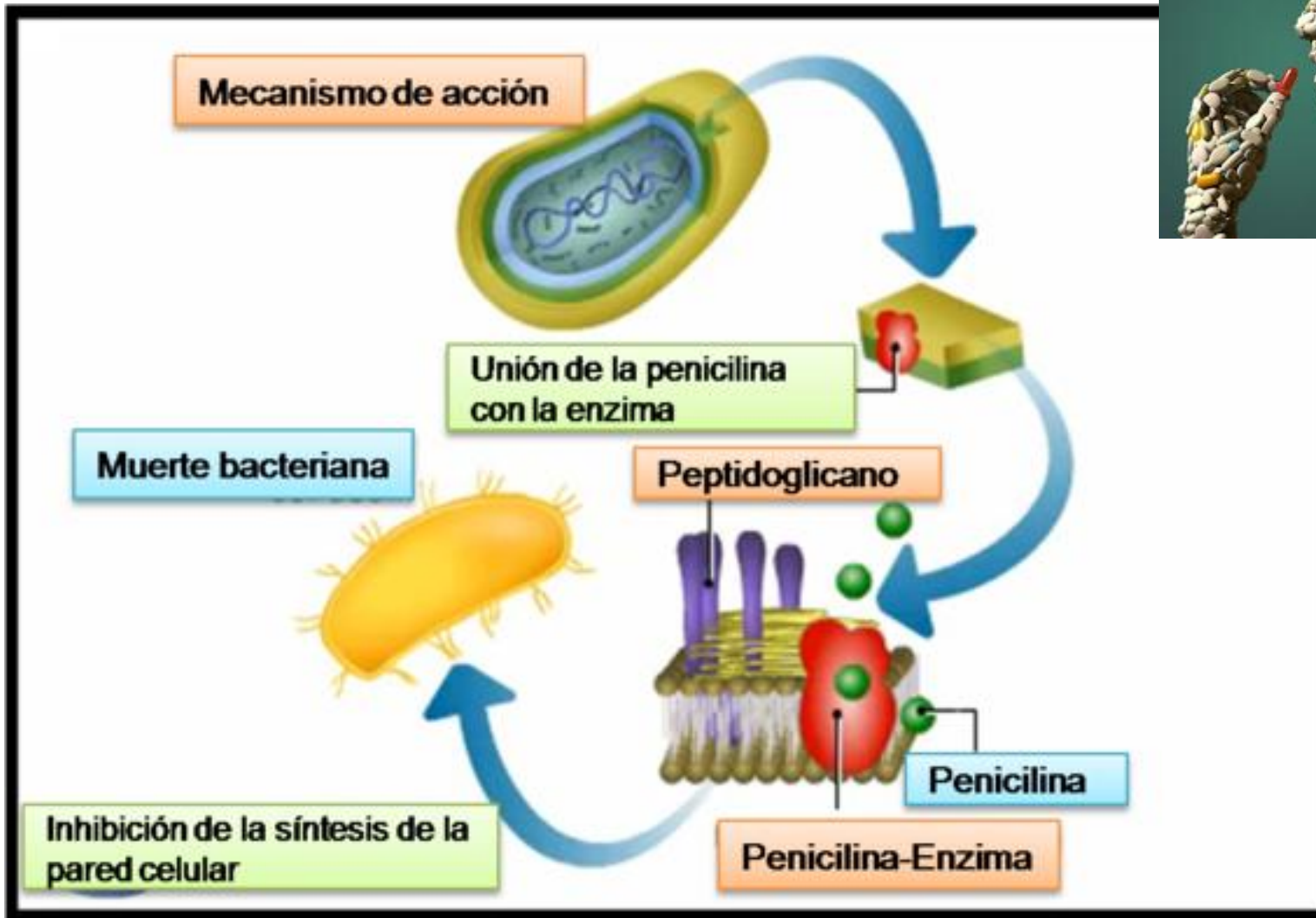
Criterio farmacológico



Criterio poblacional



# El antibiograma Vs Mecanismos de Resistencia



# Pruebas de Sensibilidad a los Antimicrobianos

## *Clasificación*

### **1. Métodos fenotípicos:**

- *Antibiograma por Dilución*
- *Antibiograma por Difusión*

### **2. Métodos bioquímicos:**

- *Detección de  $\beta$ -lactamasas: resistencia a ampicilina*
- *Detección de la PBP2a: resistencia a oxacilina*

### **3. Métodos genéticos:**

- Detección de genes de resistencia, generalmente mediante técnicas de PCR.

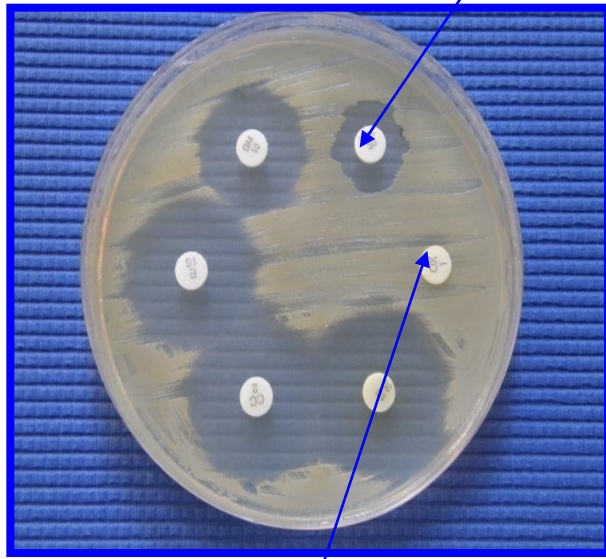
# Pruebas de Sensibilidad a los Antimicrobianos

## 1.-Métodos fenotípicos

Antibiograma por difusión

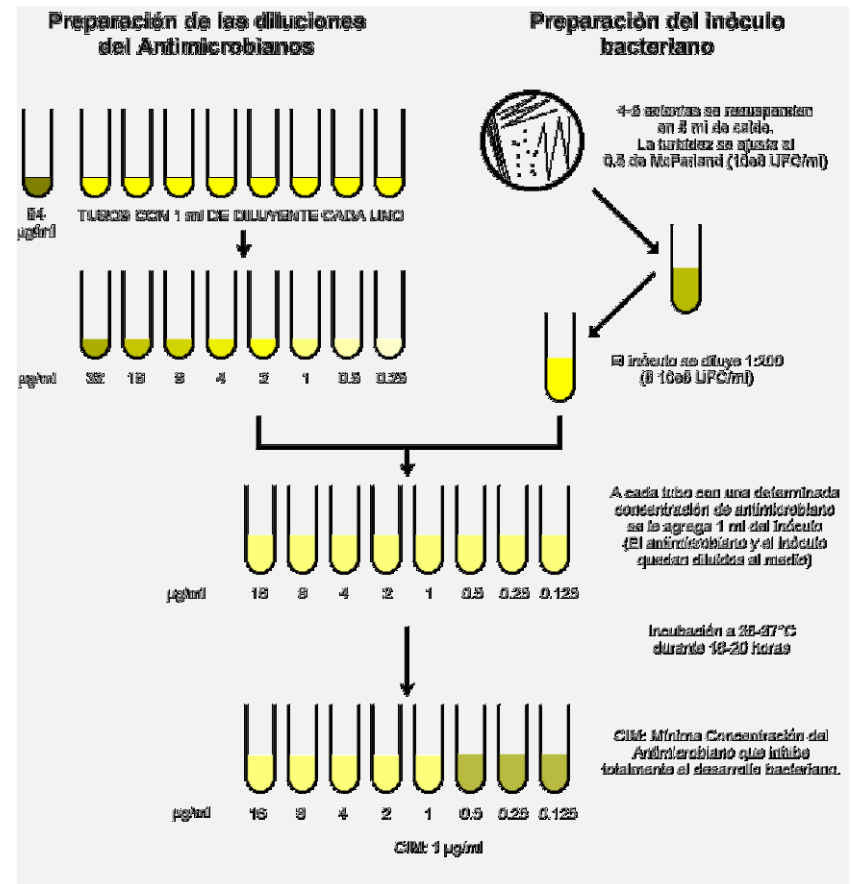
Detección fenotípica:

Resistencia a cefoxitina



oxacilina

Antibiograma por dilución:





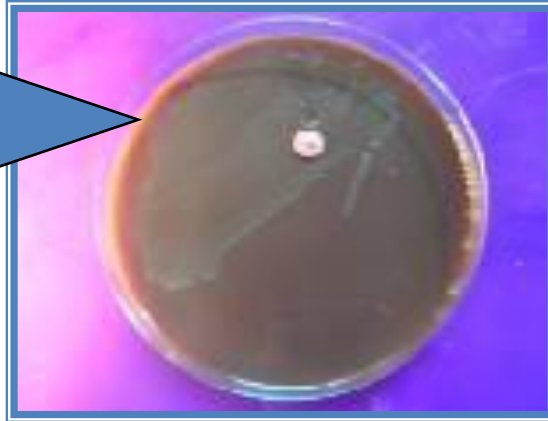
# Pruebas de Sensibilidad a los Antimicrobianos

## 2.- Métodos bioquímicos

### PRODUCCIÓN DE $\beta$ -LACTAMASAS

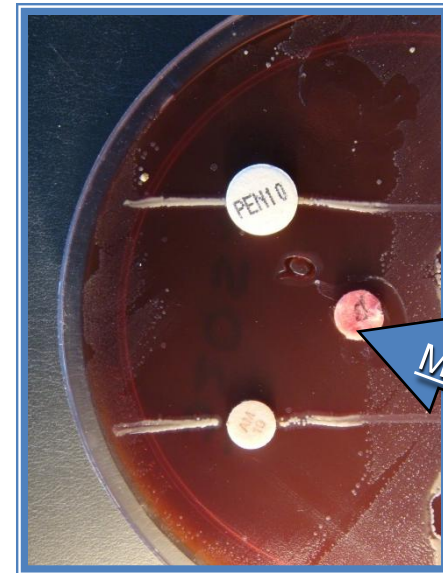
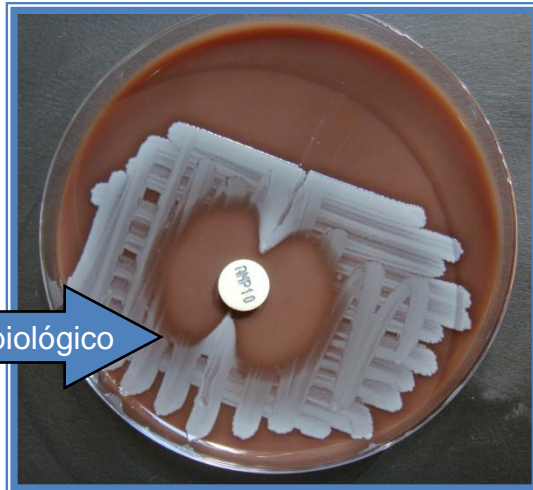
Método: nitrocefín

*Neisseria gonorrhoeae*



Método microbiológico

*Haemophilus influenzae*



Método: nitrocefín

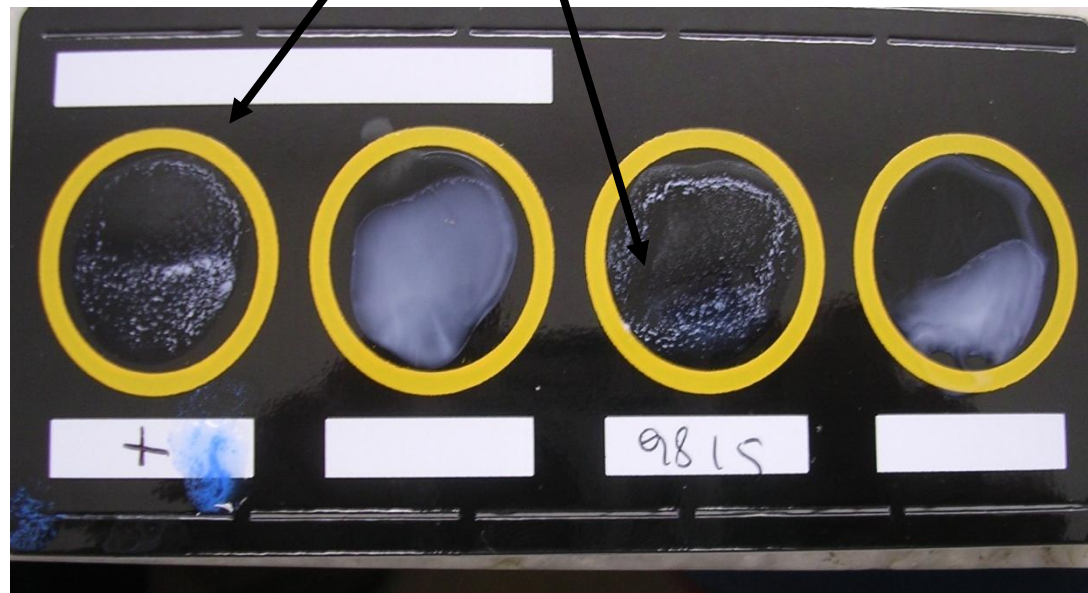
*Enterococcus faecalis*

# Pruebas de Sensibilidad a los Antimicrobianos

## 2.- Métodos bioquímicos

### Meticilino resistencia (latex)

•PLP (+)

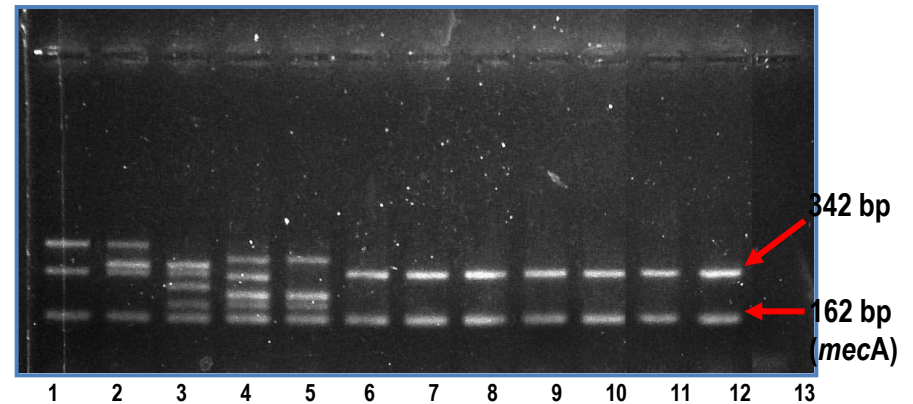


# Pruebas de Sensibilidad a los Antimicrobianos

## 2.- Métodos genéticos

### Meticilino resistencia (PCR)

• *mec A* (+)



- |    |        |     |                     |
|----|--------|-----|---------------------|
| 1. | COL    | 7.  | 6588 / 3068 - LP    |
| 2. | PER34  | 8.  | 6592 / 2258 - LP    |
| 3. | BK2464 | 9.  | 6595 / 2296 - LP †  |
| 4. | ANS46  | 10. | 6598 / 2502 - TQ    |
| 5. | HU25   | 11. | 6599 / 2520 - BAL † |
| 6. | HDE288 | 12. | 6600 / 29948- Hemo  |
|    |        | 13. | Control negativo -  |

# RESISTENCIA INTRINSECA Y NATURAL

NATURAL: GRAM (+) : R a polimixina

INTRINSECA:

**Bacilos GRAM (-):** R a glucopéptidos, eritromicina

***Proteae:*** R a nitrofuranos-polimixina.

***Serratia spp:*** R a polimixina

***Enterobacter spp:*** R a cefalotina

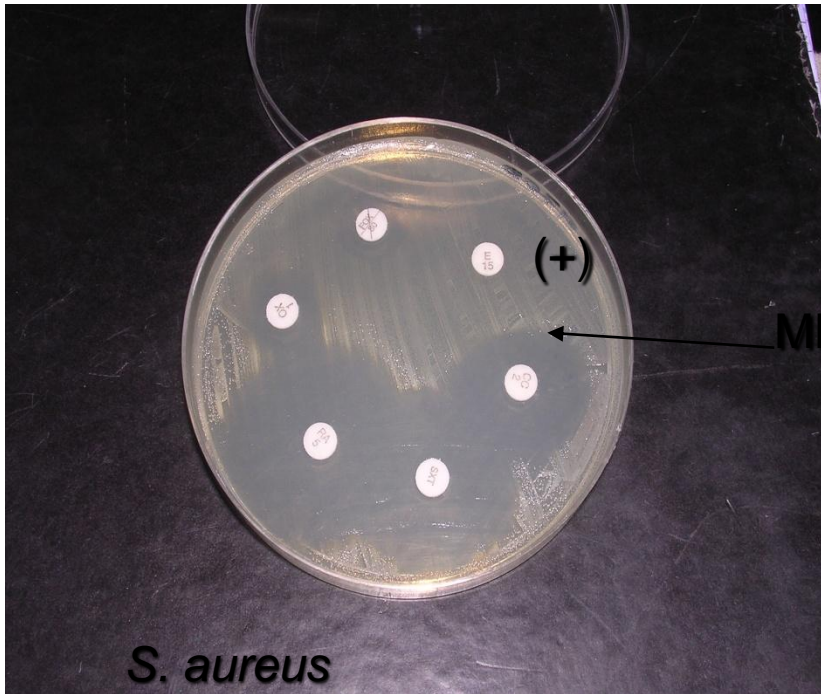
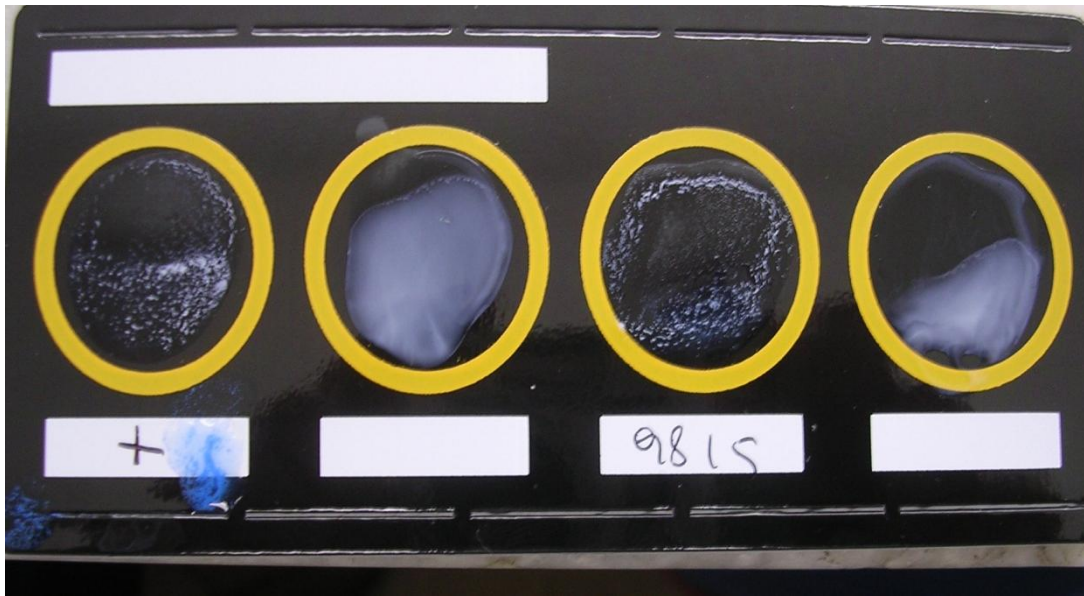
***Klebsiella spp:*** R a ampicilina

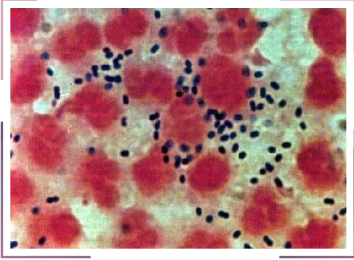
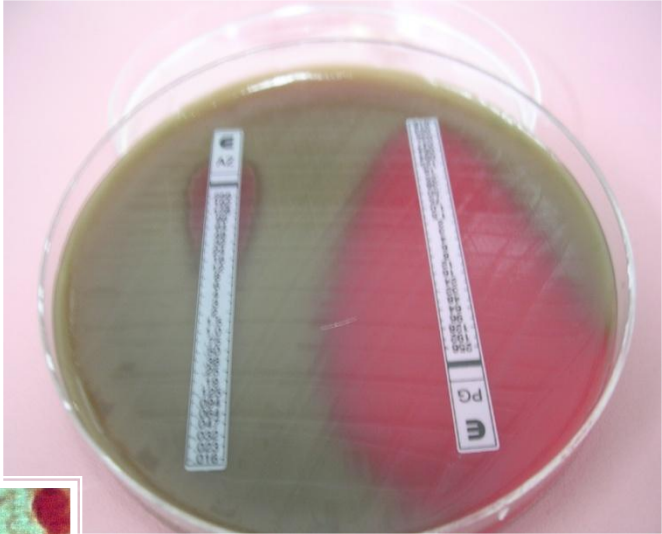
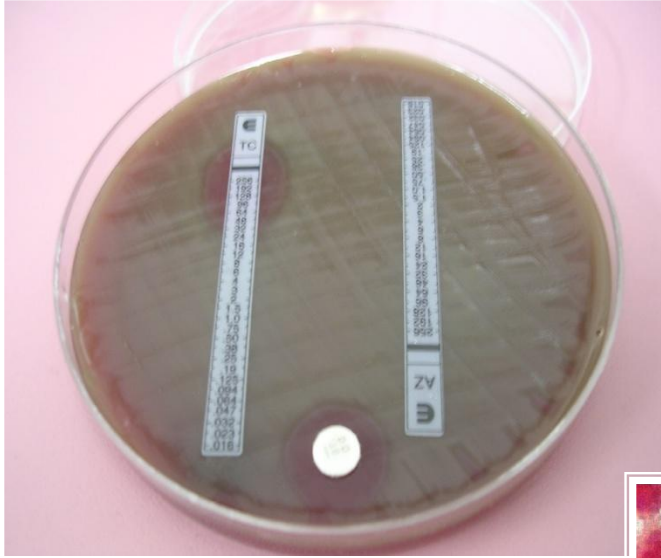
***Enterococcus spp:*** R a Cef.1ºG- R de bajo nivel AG.

R a imipenem: ***S. malthophilia, E. faecium, E. raffinosus***

R a vancomicina: ***E. gallinarum, E. casseliflavus***

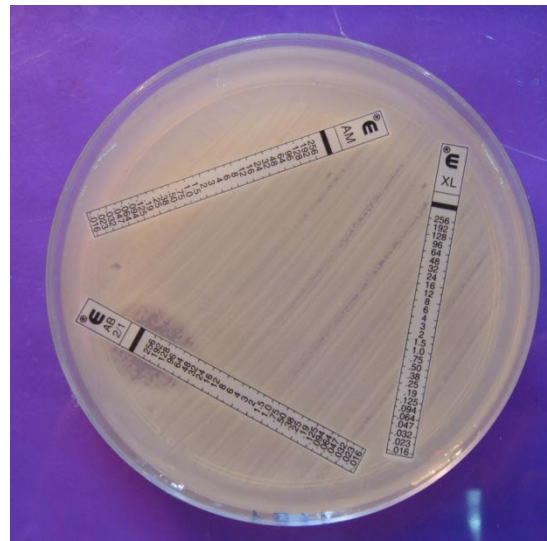
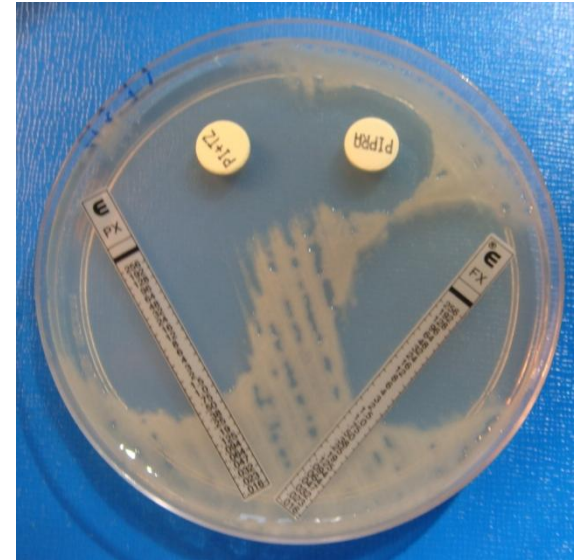
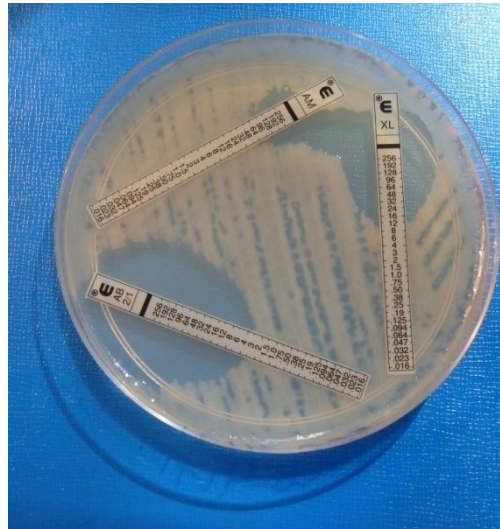








# E. coli: Comportamiento frente a IBL





# $\beta$ -LACTAMASAS PLASMIDICAS

•  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE):



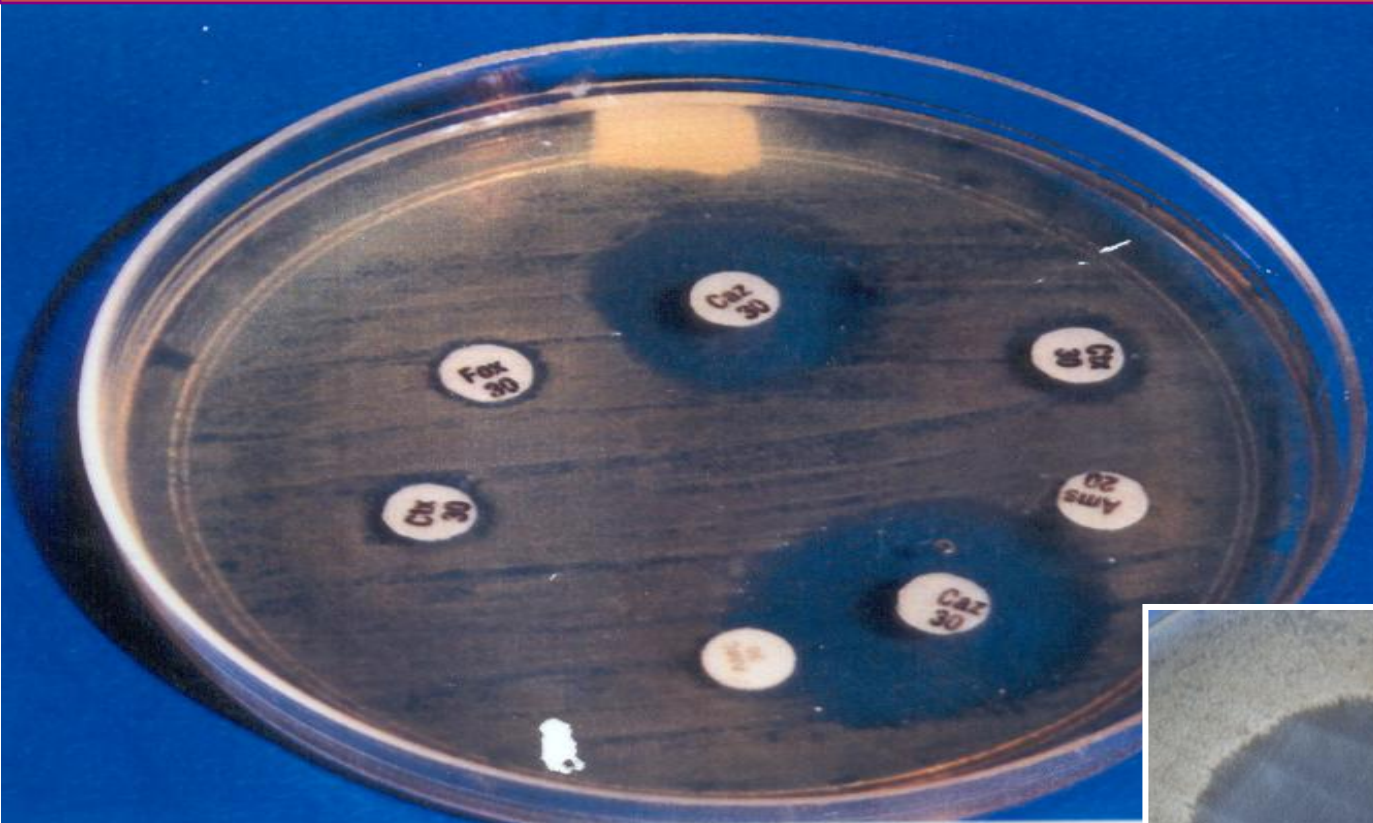
TEMderiv

SHVderiv

PER1-2

CTXMderiv

# *Citrobacter freundii* (AmpC + BLEE)



# Curva de muerte

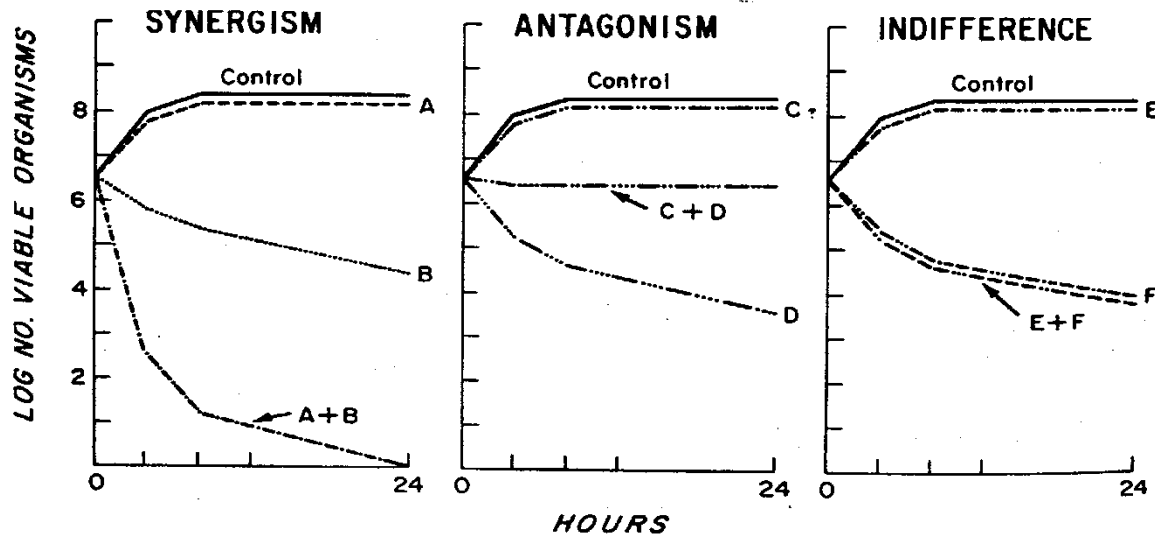
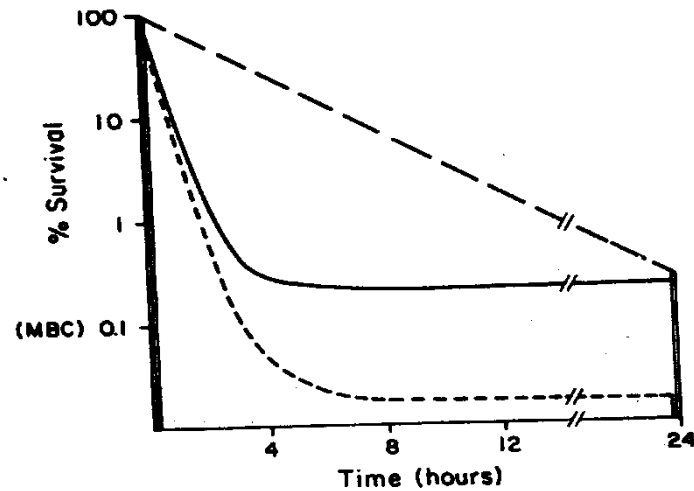
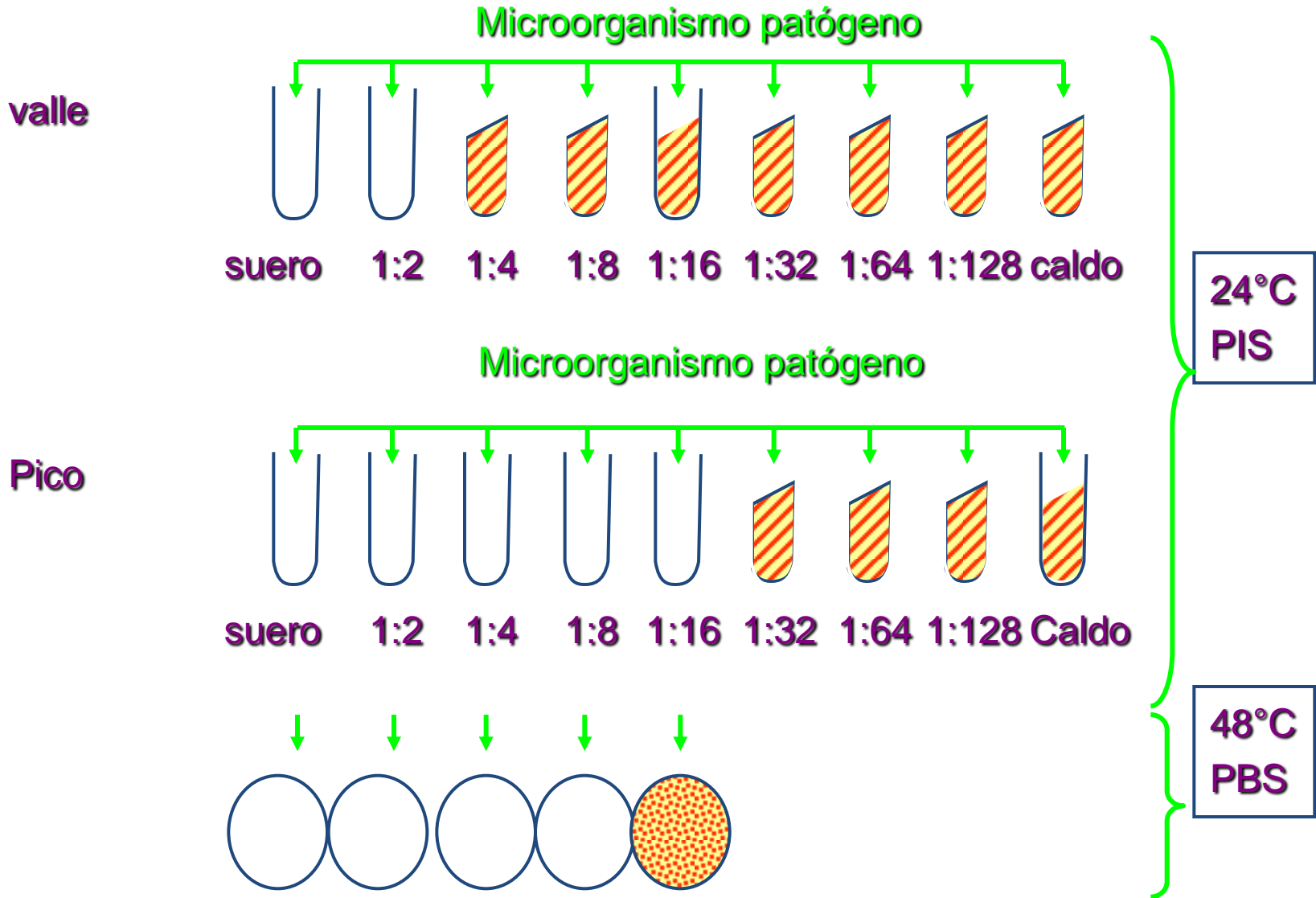


Figure 9.6. Effects of antimicrobial combinations as measured with the killing-curve method. A + B, synergism; C + D, antagonism; E + F, autonomy (or indifference).

# PODER INHIBITORIO / BACTERICIDA DEL SUERO



*Resistencia a los antibióticos Amenaza  
vigente para la  
Salud pública*



**NO PUEDES VENCER A QUIEN NO SE RINDE**