

# Mecanismos de acción y resistencia a colistín. Pruebas de tamizaje para evaluación de sensibilidad a colistín.

**Bioq. Melina Rapoport**

Servicio Antimicrobianos, INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”.

Lab. Nacional/Regional de Referencia en Resistencia a los Antimicrobianos.

Centro Colaborador de OMS en Vigilancia de Resistencia a los Antimicrobianos.

[www.antimicrobianos.com.ar](http://www.antimicrobianos.com.ar)

TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS



Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura



ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL  
*Proteger a los animales, preservar nuestro futuro*



Unión Europea

ANTIBIOGRAMA
AMPICILINA
AMOXICILINA/CLAVULANICO
C1G: CEFALOTINA/CEFAZOLINA
CEFOXITINA
C3G: CEFOTAXIMA/CEFTACIDIMA*
AC. NALIDIXICO
CIPROFLOXACINA
ENROFLOXACINA
FLORFENICOL
ESTREPTOMICINA
GENTAMICINA
AMICACINA
TRIMETOPRIMA/SULFAMETOXAZOL
<b>COLISTIN</b>
FOSFOMICINA
TETRACICLINA**
AZITROMICINA (solo en Salmonella)

β-lactámicos

Polipéptidos

\*(Ceftiofur) Si hay R a C3G → IMIPENEM

\*\*Si hay R a TET → TIGECICLINA



**VIGILANCIA  
INTEGRADA DE RAM  
EN ANIMALES.**

**PANEL DE ATB A VIGILAR EN  
E. coli y Salmonella**

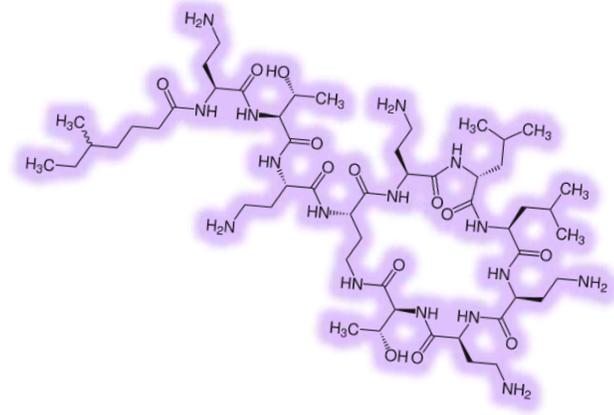
# Polipeptidos: Colistin y Polimixina-B

Moléculas grandes, anfipáticas y con varias cargas positivas

Drogas antiguas

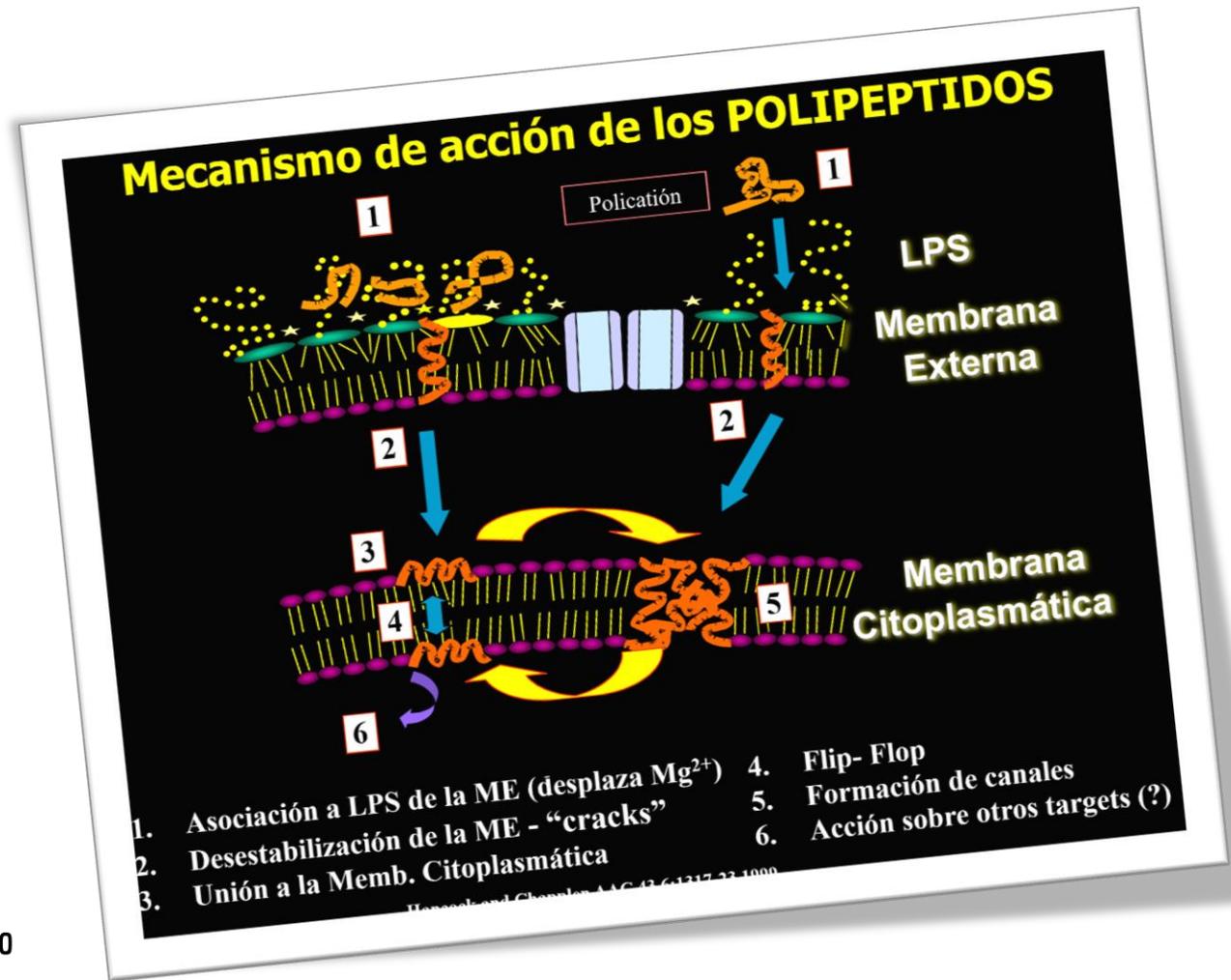
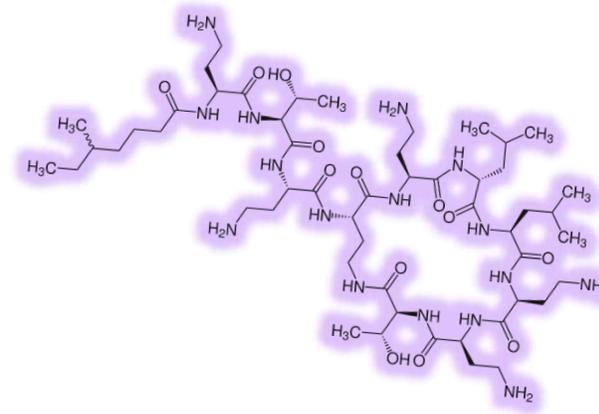
En humanos: Terapia de rescate = alternativa de tratamiento para gérmenes MDR/XDR

En animales: el Colistín se utiliza ampliamente para prevenir infecciones y como promotor de crecimiento en animales para consumo



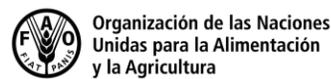
# Colistin y Polimixina-B

## Mecanismo de Acción



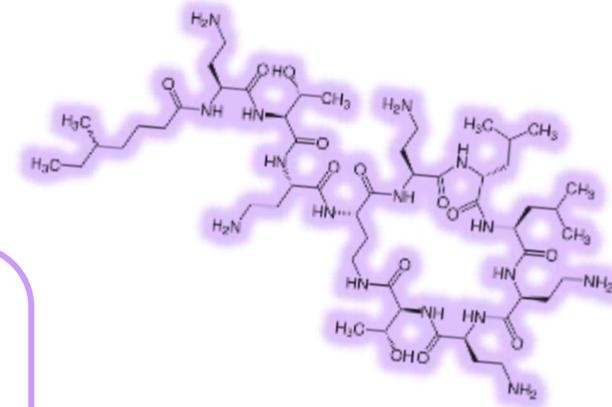
**Mecanismo de acción:**  
 Unión al LPS de la membrana externa:  
 Detergente catiónico, solubiliza membranas.  
 Bactericida.

TRABAJANDO  
 JUNTOS  
 PARA COMBATIR  
 LA RESISTENCIA  
 A LOS ANTIMICROBIANOS



# Colistin y Polimixina-B

## Mecanismos de Resistencia

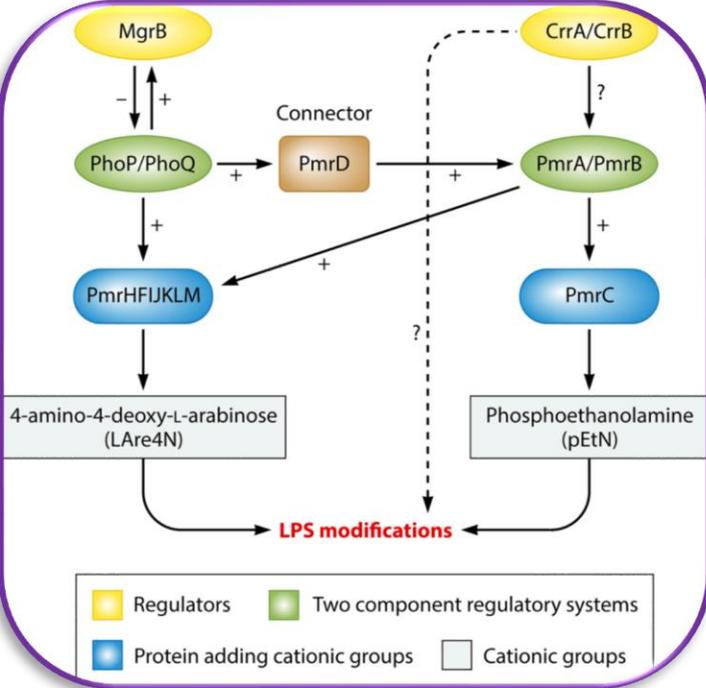


### Mecanismos de resistencia:

- **Cromosómico:** modificación de LPS por incorporación de residuos con carga positiva: L-ara-4N, PEtN.

- **Plasmídico:** adquisición del gen **MCR** (Mobile Colistin Resistance) = PEtN-transferasa adiciona pEtN al lípido A del LPS.

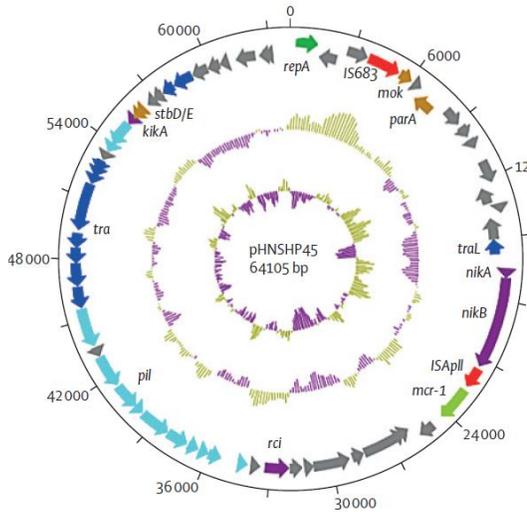
La resistencia por mutaciones cromosómicas o por adquisición de MCR son indistinguibles fenotípicamente



# Resistencia plasmídica transferible MCR

MCR (Mobile Colistin Resistance): enzima de la familia de las fosfoetanolamino-transferasas, adiciona pEtN al lípido A del LPS.  
A la fecha MCR-1 a 10

❖ Primera descripción de *mcr-1* en China Nov 2015\*: *E. coli* de cerdos y luego en otros animales de consumo, alimentos y muestras clínicas de pacientes.



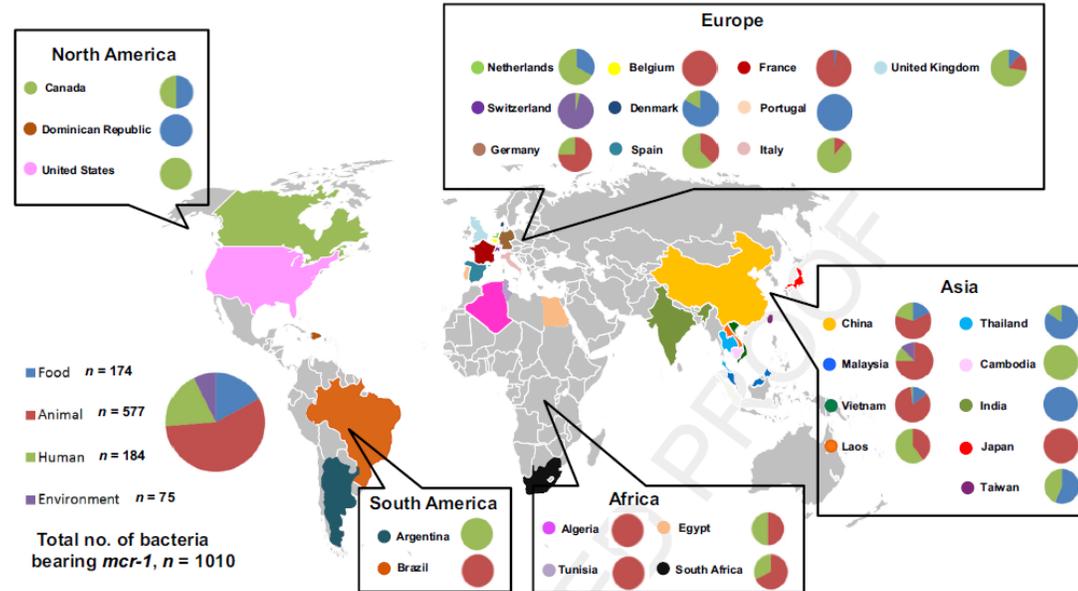
## ❖ Distribución mundial

❖ Muestras humanas, animales, alimentos y ambientales.

❖ Principalmente en *E. coli*.

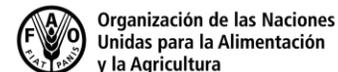
❖ Plásmidos principales: IncI2, IncX4, IncHI2

❖ Asociación con mecanismos de R: CTX-M, CMY, NDM, KPC, OXA-48.

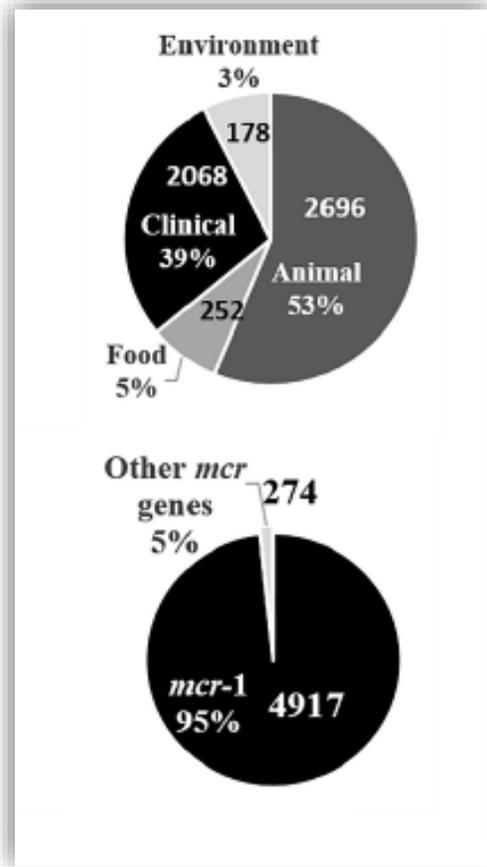


Yi-Yun Liu y col. Lancet Infect Disease 2015; Skov RL Eurosurveillance 2016; Poirel L JAC 2016; Baron S IJAA 2016; Poirel L CMR 2017; Kluytmans J Eurosurveillance 2017; Faccone D RPSP 2020.

TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS



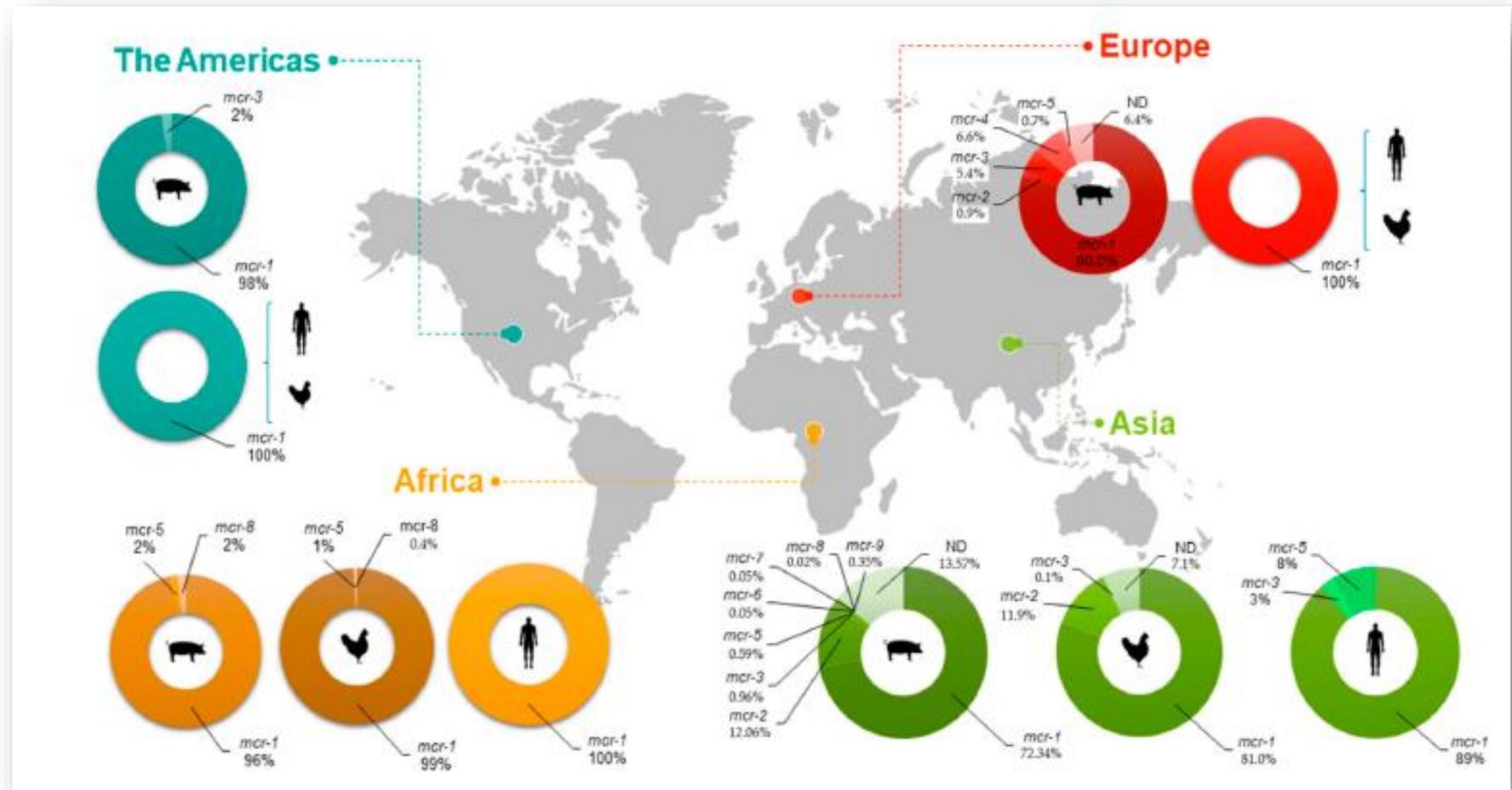
## Distribución global de mcr en función del huésped



Global Burden of Colistin-Resistant Bacteria: Mobilized Colistin Resistance Genes Study (1980–2018). Elbediwi M y col. *Microorganisms* 2019, 7, 461;

TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS

## Distribución global de variantes de mcr en *E. coli* de muestras de cerdos, pollos y humanos sanos



Worldwide Prevalence of mcr-mediated Colistin-Resistance *Escherichia coli* in Isolates of Clinical Samples, Healthy Humans, and Livestock—A Systematic Review and Meta-Analysis. Bastidas-Caldes Carlos y col. *Pathogens* 2022, 11, 659.

## MCR en LATINOAMERICA

Aislamientos clínicos humanos (infección y colonización)  
Aislamientos clínicos de animales (grandes y de compañía).  
Animales para consumo: cerdos, pollos (sanos)  
Aves de corral, pingüinos, gaviotas.  
Alimentos procesados

Alto de nivel de portación en población sana (Bolivia)

*E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. amalonaticus*, *C. braakii*,  
Salmonella, Shigella

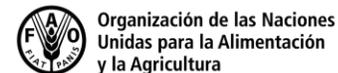
MCR-1 y variantes, MCR-5 y MCR-9

Aislamientos genéticamente no relacionados.  
Alta diversidad clonal en *E coli*



Quiroga C. y col 2019 RAM; Dominguez J y col 2019 Front. Cell. Infect. Microbiol: Rumi MV y col. 2019 Vet Mic; Sennati S y col. 2017 JAC; Giani T. y col 2018 EuroSurveillance; Legarraga P y col. 2018 Rev Chilena Inf.; Melgarejo Touchet N. y col 2018 Rev Sal Pub Paraguay.; Ugarte Silva RG y col. 2018 An Fac Med.; Medina J y col. 2017 Rev Med Uruguay; Delgado-Blas JF y col. 2016 AAC.

TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS



✓ La detección de genes *mcr* aumento en términos de dispersión y variantes

✓ Transmisión favorecida por exposición a bajas concentraciones de colistín: uso veterinario y profilaxis = el uso de colistín en animales para consumo humano sería responsable de la aparición y transmisión de genes *mcr*.

✓ La prevalencia de genes *mcr* en animales >> humanos sanos o muestras clínicas.

✓ Se ha sugerido que los plásmidos portadores de *mcr* se mueven desde los animales hacia los humanos



En enero de 2019 el Ministerio de Agricultura de la Argentina prohibió el uso de colistín con fines veterinarios.

(<http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/31500-0-19999/318811/norma.htm>).

# PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

## 1) ANTIBIOTICO:

Para las pruebas in vitro se debe usar **Colistin-sulfato** (no usar Col+Metanosulfonato)

TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS



Organización de las Naciones  
Unidas para la Alimentación  
y la Agricultura



ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL  
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro



# PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

## 1) ANTIBIOTICO:

Para las pruebas in vitro se debe usar **Colistin-sulfato** (no usar Col+Metanosulfonato)

## 2) PUNTOS DE CORTE: EUCAST Y CLSI.

Desde el LNR recomendamos el punto de corte EUCAST:

**$\leq 2\mu\text{g/ml}$  Sensible,  $\geq 4\mu\text{g/ml}$  Resistente**

# PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

## 1) ANTIBIOTICO:

Para las pruebas in vitro se debe usar **Colistin-sulfato** (no usar Col+Metanosulfonato)

## 2) PUNTOS DE CORTE: EUCAST Y CLSI.

Desde el LNR recomendamos el punto de corte EUCAST:

**$\leq 2\mu\text{g/ml}$  Sensible,  $\geq 4\mu\text{g/ml}$  Resistente**

## 3) METODOLOGÍAS:

### Gold standard: Microdilución (BMD)

Joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints working Group 2016:

*Col-S + caldo MH ajustado con cationes + placas poliestireno sin aditivos*

### Metodologías alternativas aceptadas y recomendadas:

**Agar Spot, Predifusión con tabletas, Drop Test, Elución de discos.**

<http://antimicrobianos.com.ar/2017/09/protocolos-colistin/>

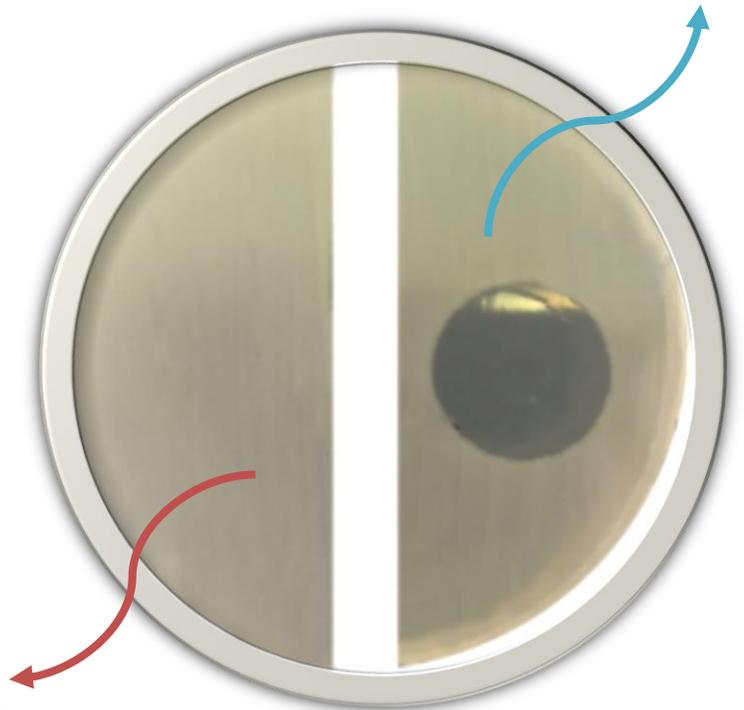
La difusión con discos no está recomendada ya que no correlaciona con las metodologías por dilución = falsa sensibilidad.

## Predifusión con tabletas de COLISTIN Rosco-Neosensitabs®

1. Colocar la tableta COL 10µg en placa de agar MH
2. Incubar 2hs a 35-37°C
3. Retirar la placa de la estufa y remover la tableta
4. Dejar la placa a T° amb 18-22hs.
5. La placa puede conservarse así pre-difundida a 4°C
6. Inocular con 0,5McF del aislamiento a ensayar
7. Incubar 18hs a 35-37°C
8. Interpretar zona de inhibición.

**Interpretación (para Enterobacterales):**  
**Puntos de corte recomendados por el fabricante**  
**S ≥16mm, I 12-15mm, R ≤11mm**

**Resistente**  
(CIM ≥4µg/ml)

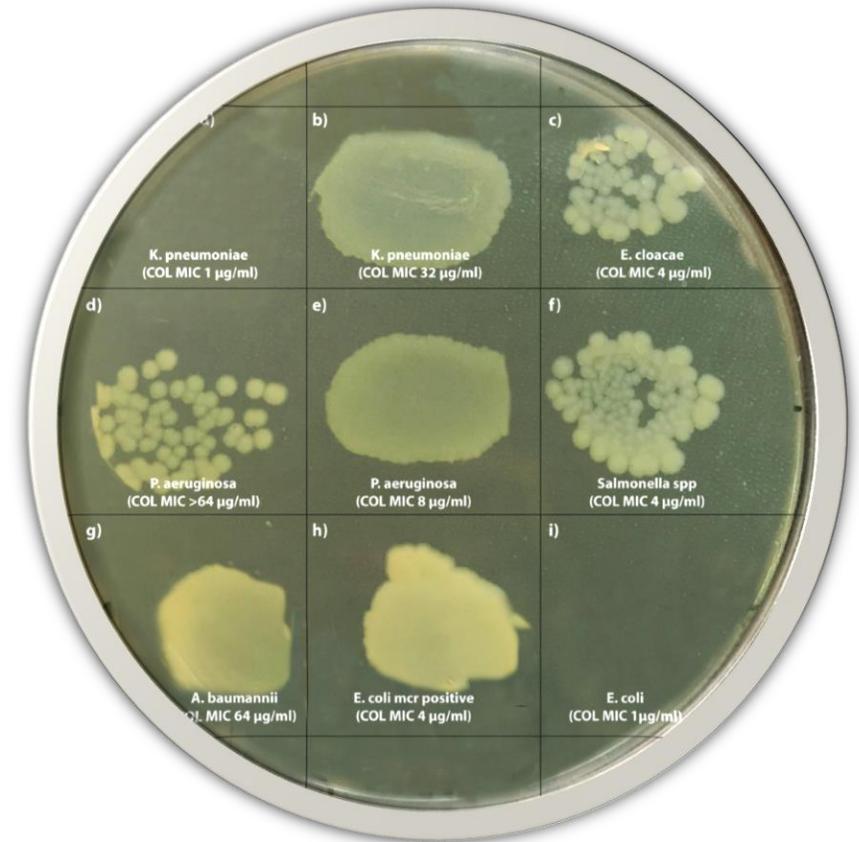


**Sensible**  
(CIM 0,5µg/ml)

Esta metodología permite detectar la resistencia a colistin mediada tanto por mecanismos cromosómicos como plasmídicos transferibles (MCR).

## Método de AGAR SPOT COLISTIN / COL-TEST®

1. Preparar inóculo del aislamiento a ensayar 0,5 McFarland
2. Embeber un hisopo estéril con el inóculo, descargar el exceso y realizar un spot de 10 cm en la placa de COL-TEST.
3. Incubar a 35-37°C durante 18-20hs.
4. Observar crecimiento e Interpretar.



### Interpretación:

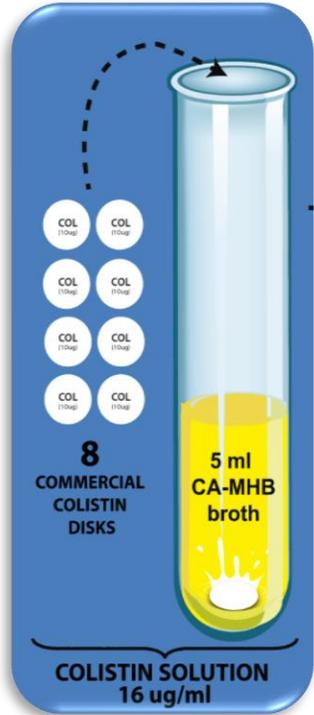
**Positivo:** Visualización de >1 colonia = Resistente a COL

**Negativo:** Visualización de 1 o ninguna colonia = Sensible a COL

Esta metodología permite detectar la resistencia a colistin mediada tanto por mecanismos cromosómicos como plasmídicos transferibles (MCR).

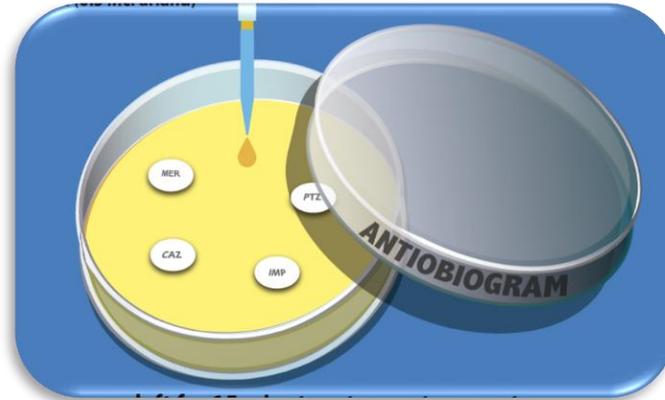
## Método de la gota o COL DROP TEST

Solución  
COL 16µg/ml



- Eluir durante 1h.
- Retirar los discos.
- Conservar a 4°C.

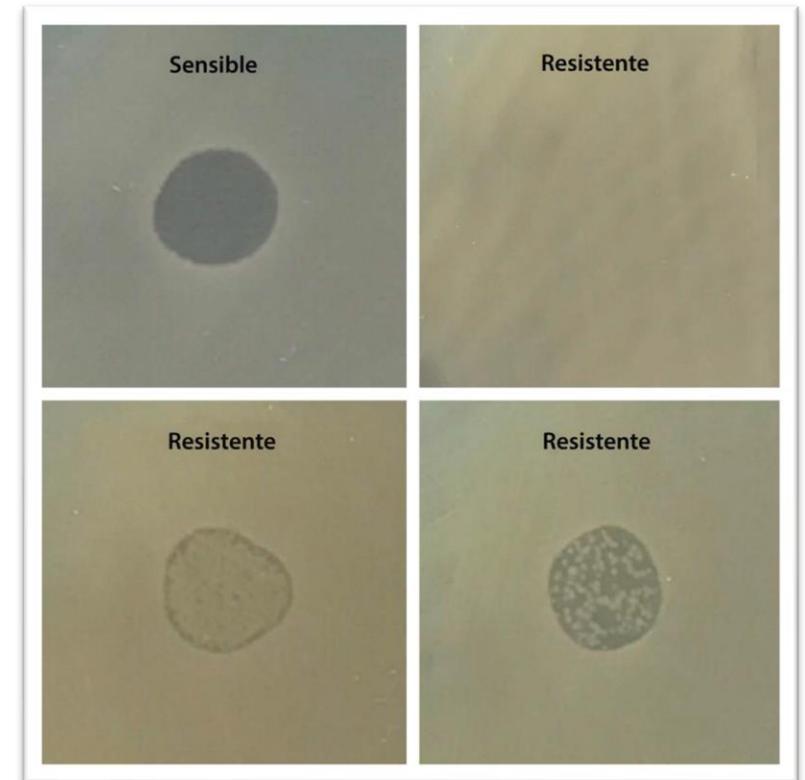
### Procedimiento



- Hisopar el agar MH con 0,5McFarland de la cepa a testear.
- Colocar 10µl de sol. COL.
- Dejar 15min que se absorba.
- Invertir la placa e incubar a 35°C 16-18h.

Esta metodología permite detectar la resistencia a colistin mediada tanto por mecanismos cromosómicos como plasmídicos transferibles (MCR).

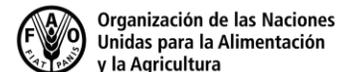
### Interpretación



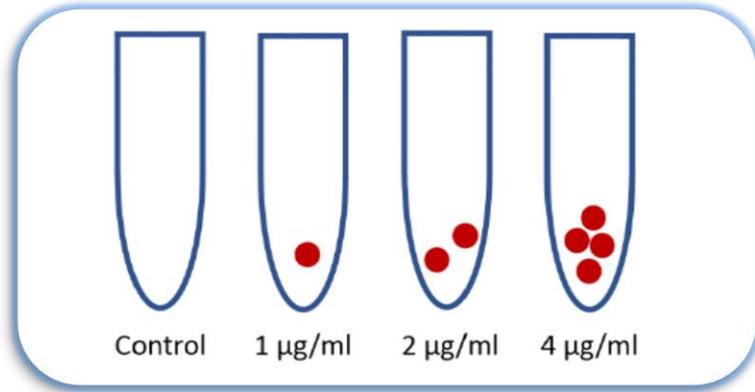
- **COL Sensible:** presencia de zona de inhibición de cualquier diámetro.
- **COL Resistente:** ausencia de zona de inhibición.

TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS

CA-MHB: caldo MH ajustado en cationes



## Método de Elución de discos de colistín



### Macrométodo

- Agregar 1, 2 y 4 discos de COL a tubos con 10ml de CAMHB.
- Agregar 50 µl del 0.5 Mc Farland
- Incubar 16-20hs

Tanto el Macro como el Micrométodo (adaptado por LNR, volumen final 1ml) pueden utilizarse para evaluar Enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter spp.*

Adaptado de: Colistin Broth Disk Elution Test, Universidad de California en Los Angeles (UCLA), USA. Junio 2017.

TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS



Organización de las Naciones  
Unidas para la Alimentación  
y la Agricultura

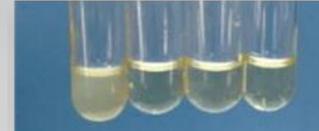


ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL  
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro

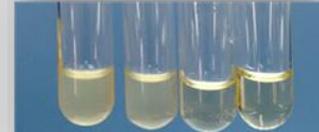


Unión Europea

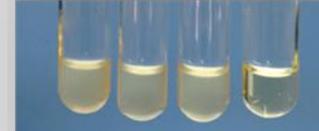
### INTERPRETACION



**SENSIBLE**



**SENSIBLE**



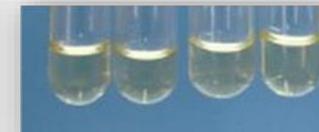
**RESISTENTE**



**RESISTENTE**

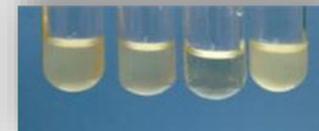
TC 1 2 4

### INTERPRETACION



**INVALIDO**

No enturbia el control de crecimiento (TC)



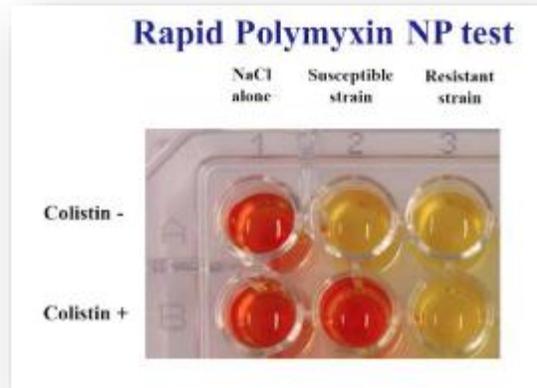
**INVALIDO**

Tubo salteado

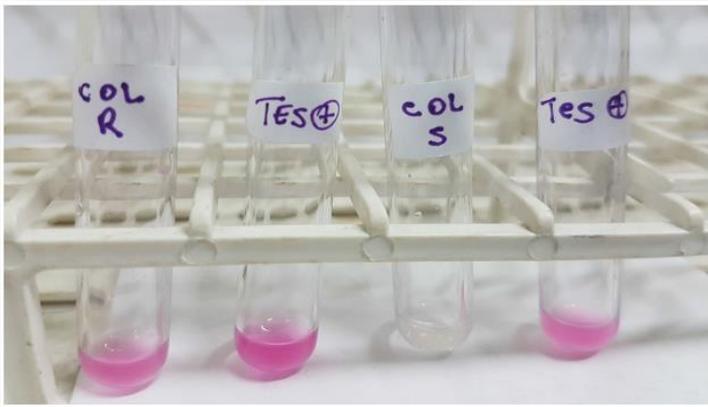
# Otras metodologías para evaluar sensibilidad a COLISTIN



SensiTest® Colistin Liofilchem.



Rapid POL-NP® Elitech (etb)

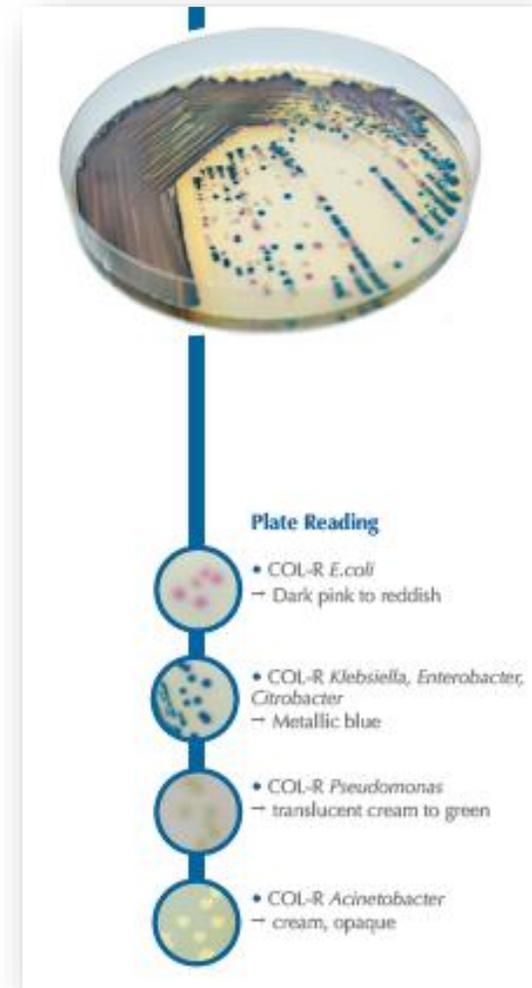


Método colorimétrico Andrade para resistencia a colistin en etb

Rodriguez C. H. y col. J. of Chemotherapy 2019



NG-TEST mcr-1



CHROM-agar COL-APSE

TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS



Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura



ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL  
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro



Unión Europea

# Muchas gracias!

Servicio Antimicrobianos  
INEI-ANLIS “Dr C. G. Malbran”

[www.antimicrobianos.com.ar](http://www.antimicrobianos.com.ar)  
[rapoport@anlis.gob.ar](mailto:rapoport@anlis.gob.ar)

TRABAJANDO  
JUNTOS  
PARA COMBATIR  
LA RESISTENCIA  
A LOS ANTIMICROBIANOS

