

Fundamento del antibiograma y CIM. Ventajas y limitaciones del antibiograma.

Ezequiel Albornoz

Servicio Antimicrobianos

INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



PRUEBAS de SENSIBILIDAD

Miden la respuesta del crecimiento de un microorganismo en presencia de una o varias drogas

OBJETIVO

- Predecir el éxito o fracaso de tratamiento antimicrobiano.**
- Combinadas con información y experiencia clínica deberían permitir la elección del antibiótico correcto para el tratamiento del paciente.**
- Vigilancia local de resistencia**

PRUEBAS de SENSIBILIDAD

Metodologías

- 1. Dilución en caldo y en agar**
- 2. Método epsilométrico (E-test[®], MICE[®], MIC Test Strips[®])**
- 3. Equipos Automatizados (VITEK2C[®], MICROSCAN[®], PHOENIX[®], SENSITITRE[®])**
- 4. Difusión en agar**

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



Organización de las Naciones
Unidas para la Alimentación
y la Agricultura



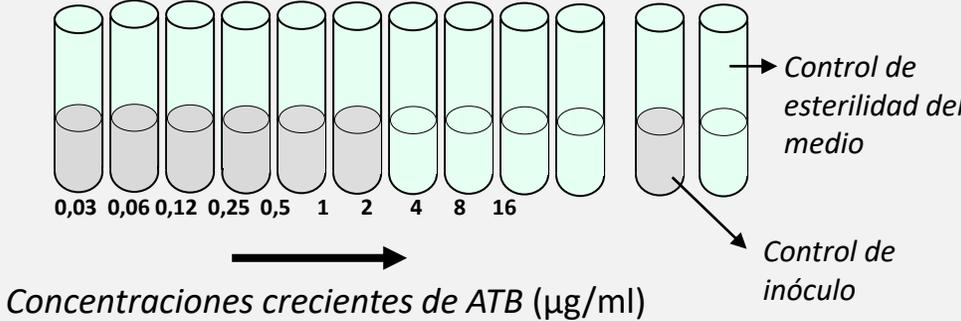
ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro



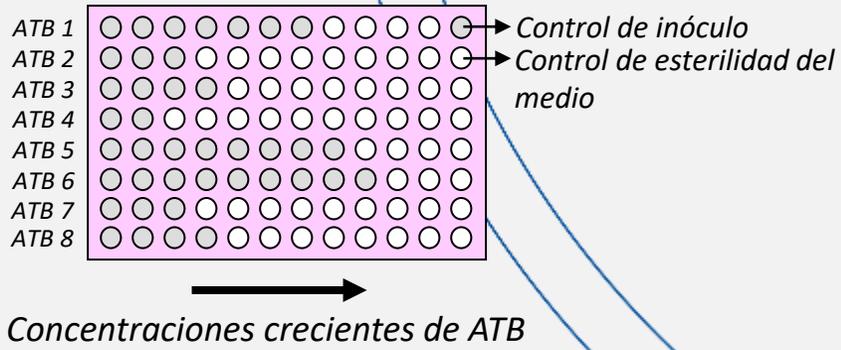
Unión Europea

1. Dilución en caldo y en agar

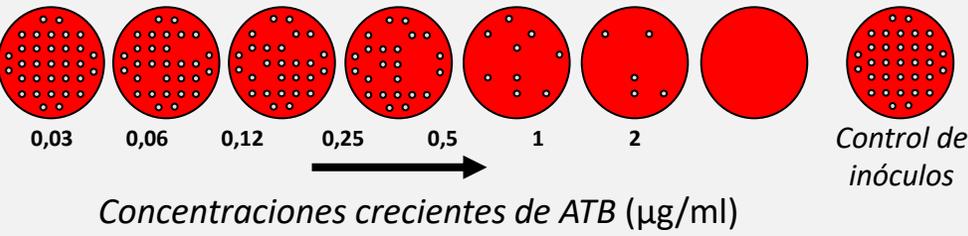
Macrodilución en caldo



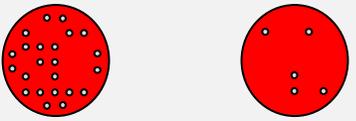
Microdilución en caldo



Dilución en agar

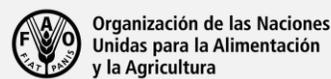


Concentración "Break-points"



CIM: concentración inhibitoria mínima

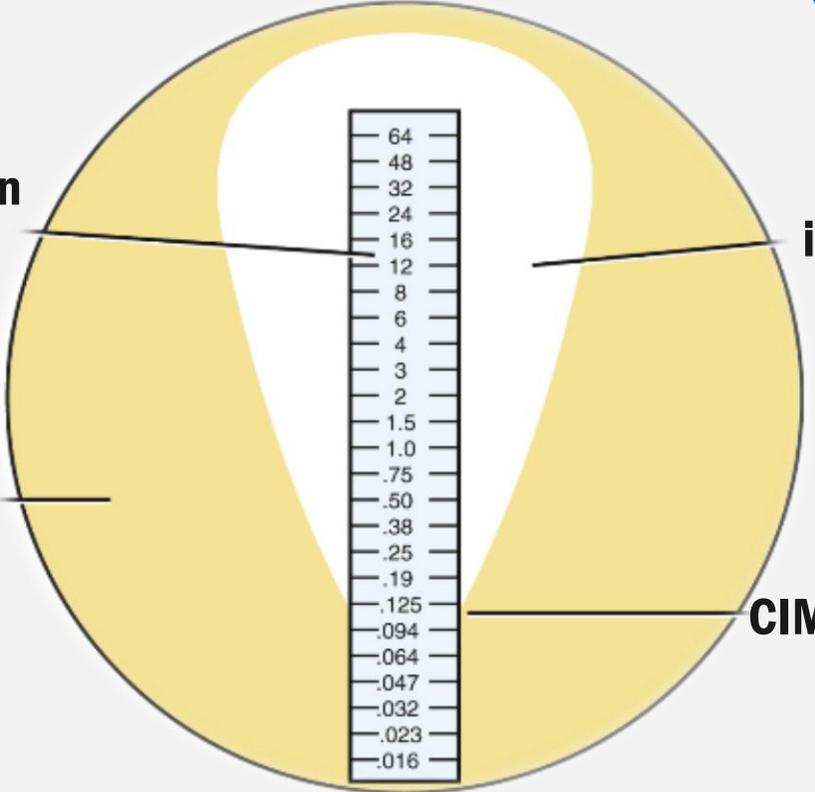
TRABAJANDO JUNTOS PARA COMBATIR LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS



2. Método epsilométrico (E-test[®], MICE[®], MIC Test Strips[®])

Tira plástica no porosa o de papel con un gradiente de concentraciones de ATB

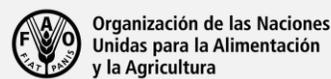
Crecimiento bacteriano



Zona de inhibición

CIM

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



3. Equipos Automatizados



VITEK2C®



MICROSCAN®

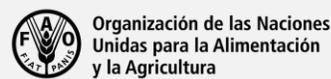


PHOENIX®

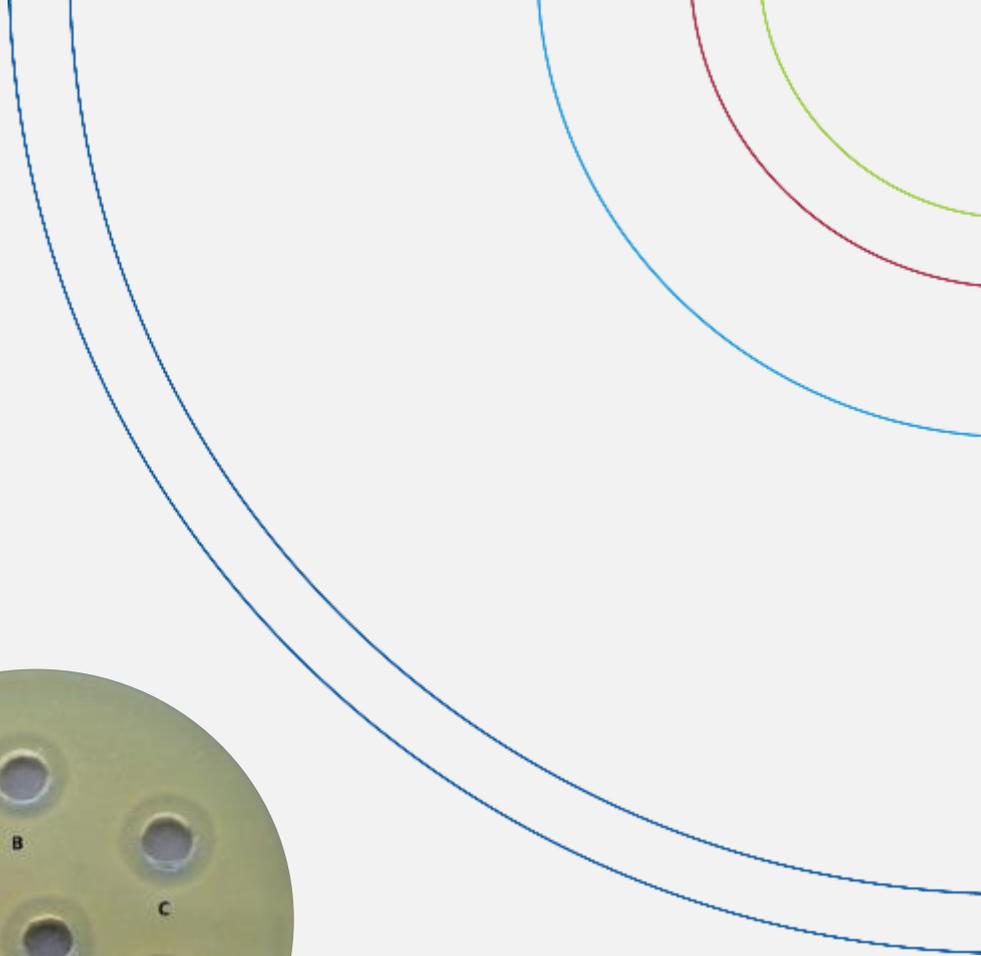
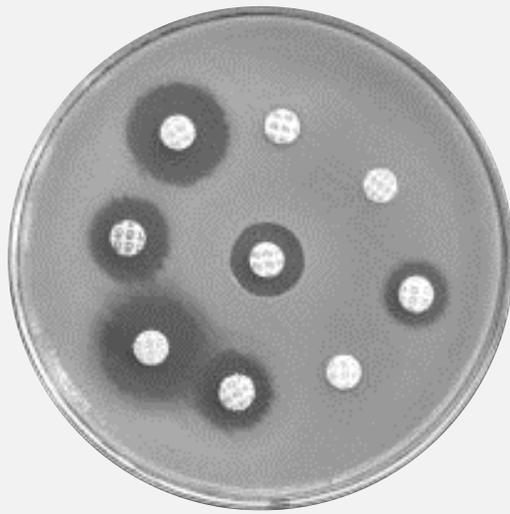
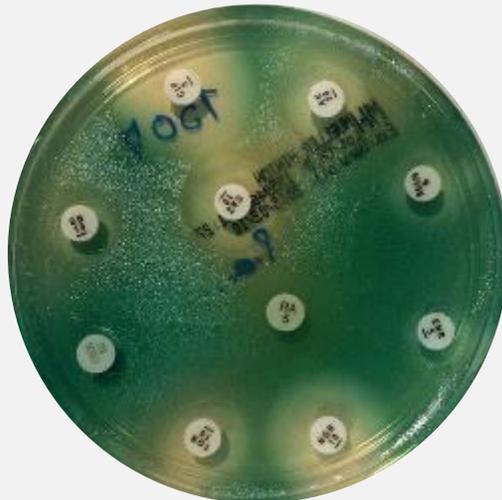
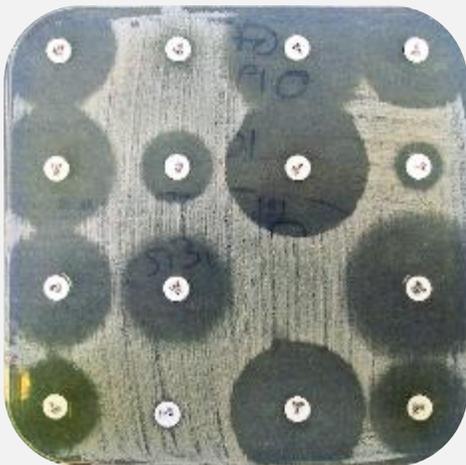


SENSITRE®

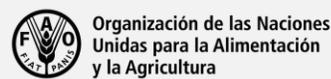
TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



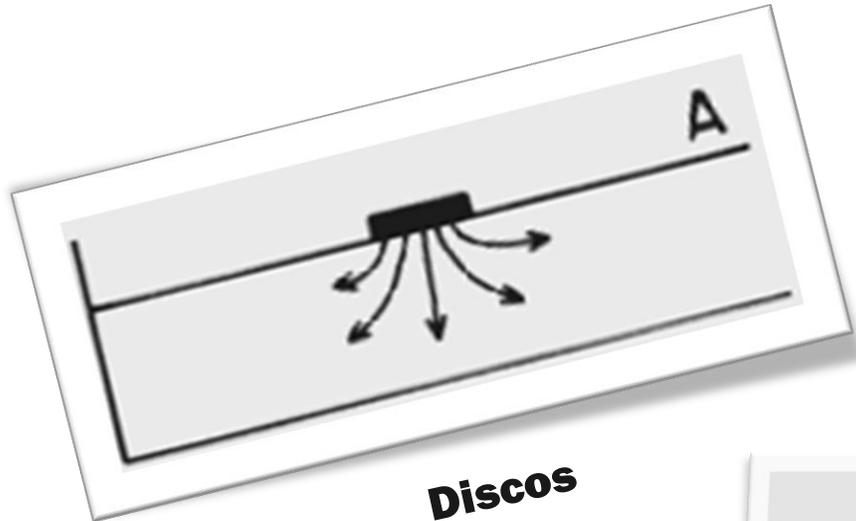
4. Difusión en Agar



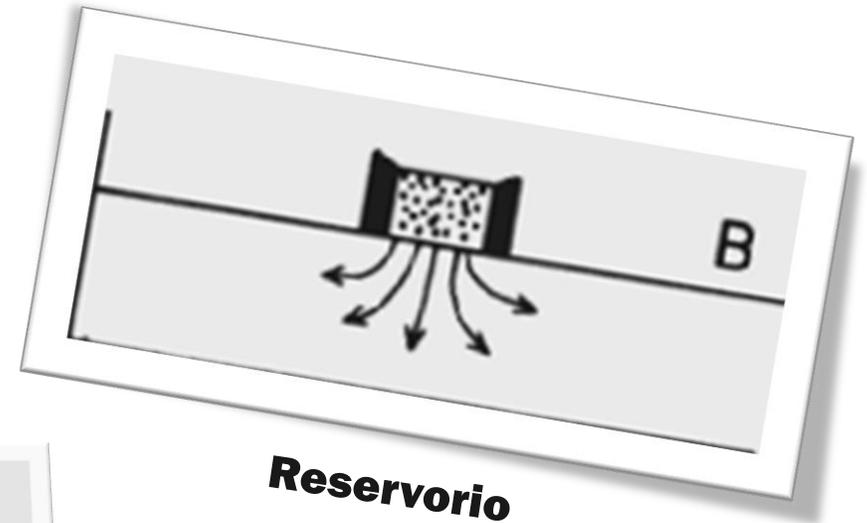
TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



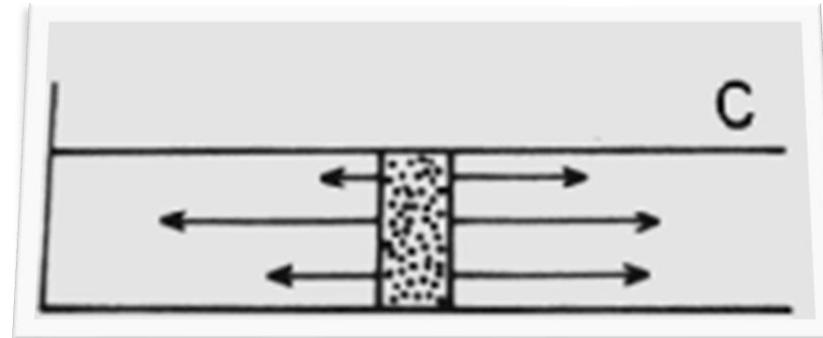
APLICACIÓN DE ANTIBACTERIANOS SOBRE PLACAS DE AGAR



Discos



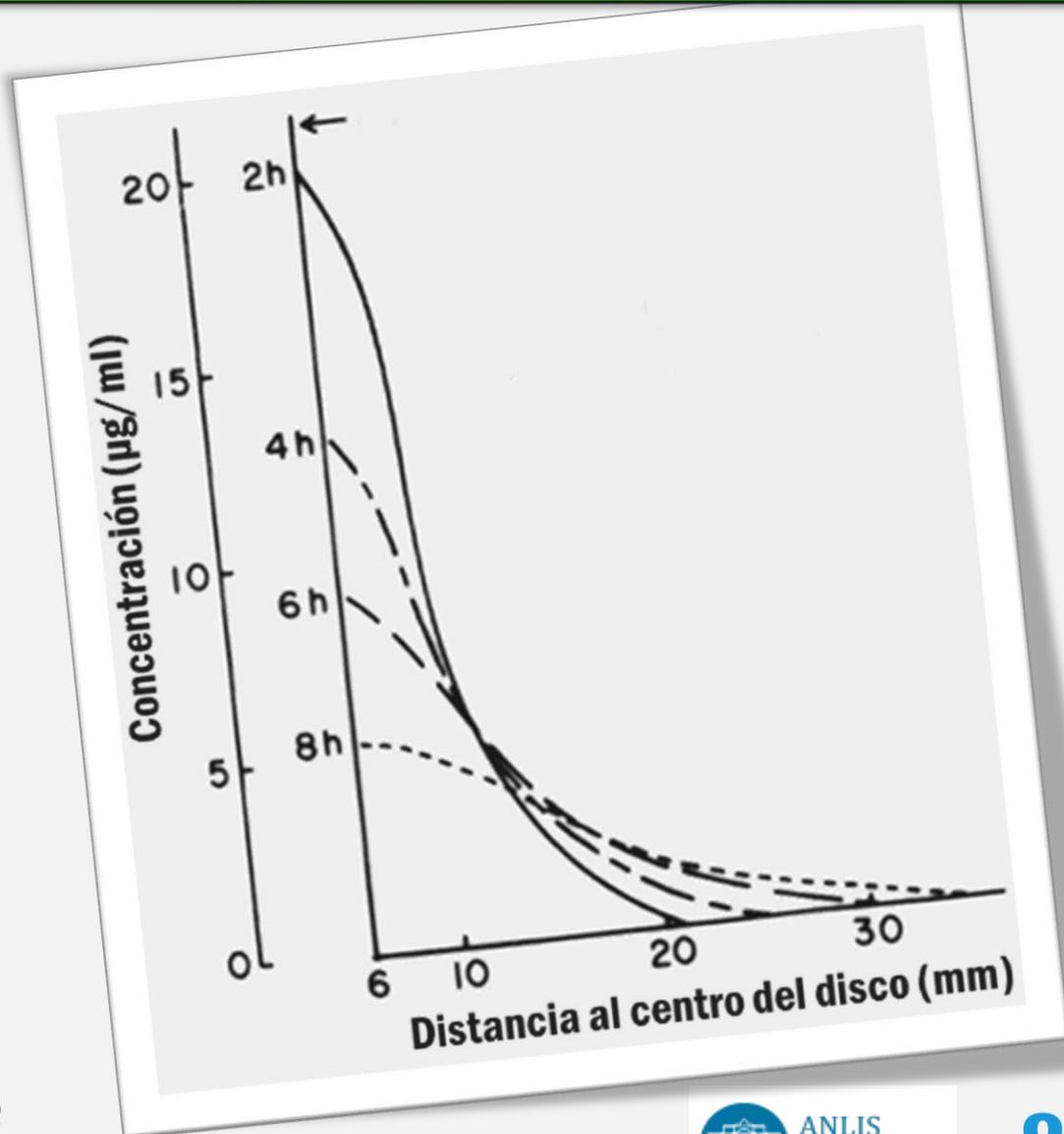
Reservorio



Orificio en el agar

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS

CINETICA DE LA DIFUSION DE ANTIMICROBIANOS



TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



Organización de las Naciones
Unidas para la Alimentación
y la Agricultura

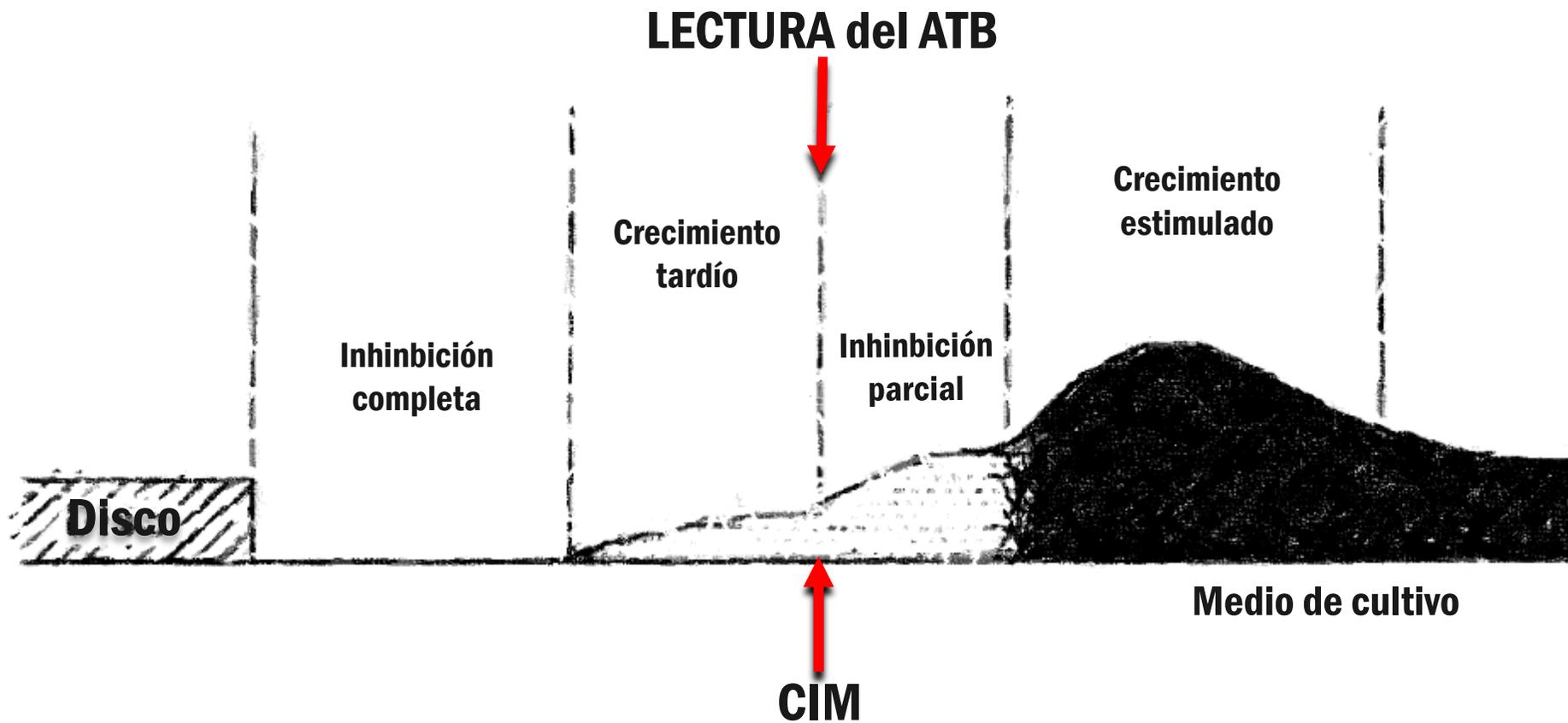


ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro



Unión Europea

Diagrama de la respuesta bacteriana a un gradiente de concentración de antimicrobianos



TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



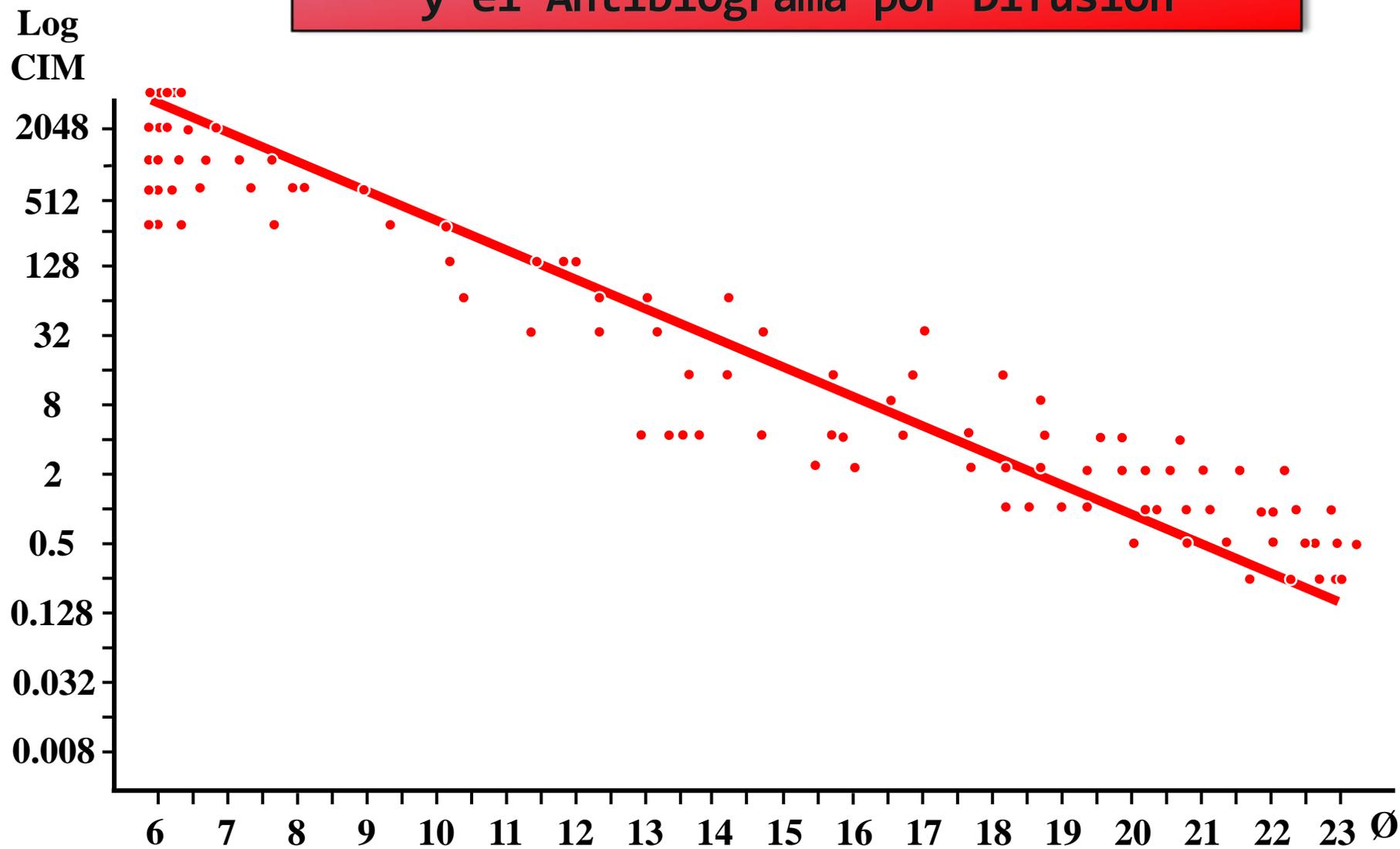
Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura



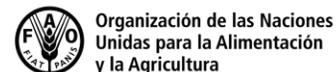
ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro



Relación entre el "gold standard" (CIM) y el Antibiograma por Difusión



TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS





**CLINICAL AND
LABORATORY
STANDARDS
INSTITUTE™**

M2-13th Edition: Método de difusión

Se actualizan cada 3 años (2018)

M7-11th Edition: Método de dilución

M100-32nd Edition: Tablas complementarias

Se actualiza todos los años (2022)

**TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS**



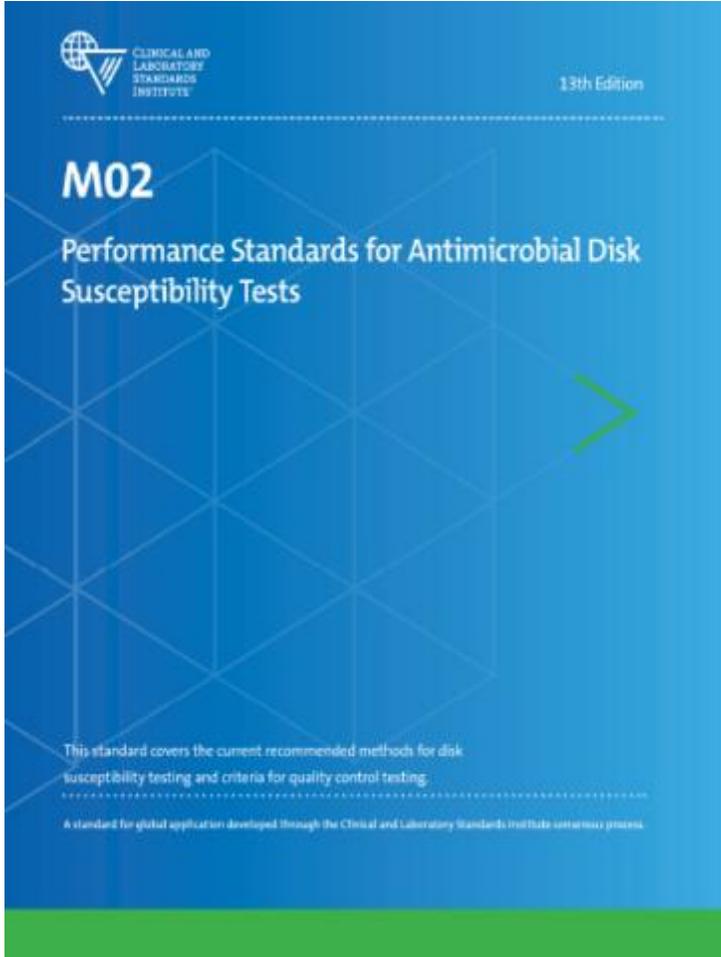
**Organización de las Naciones
Unidas para la Alimentación
y la Agricultura**



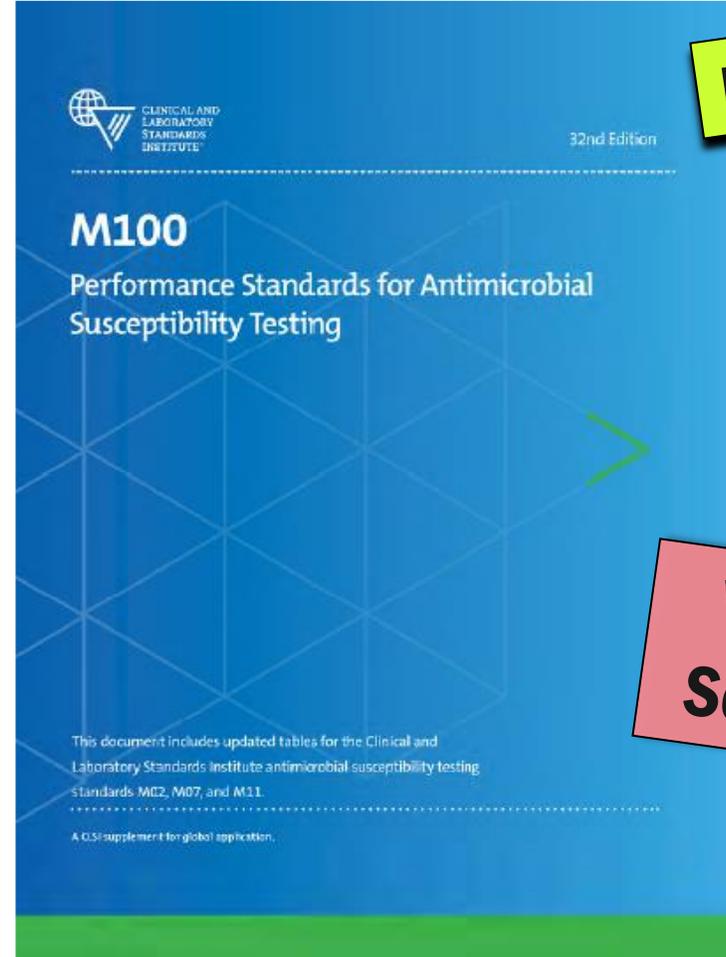
ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro



Documento M2-13º Ed. (2018)



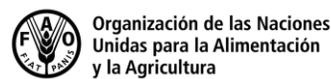
Documento M100 32º Edición



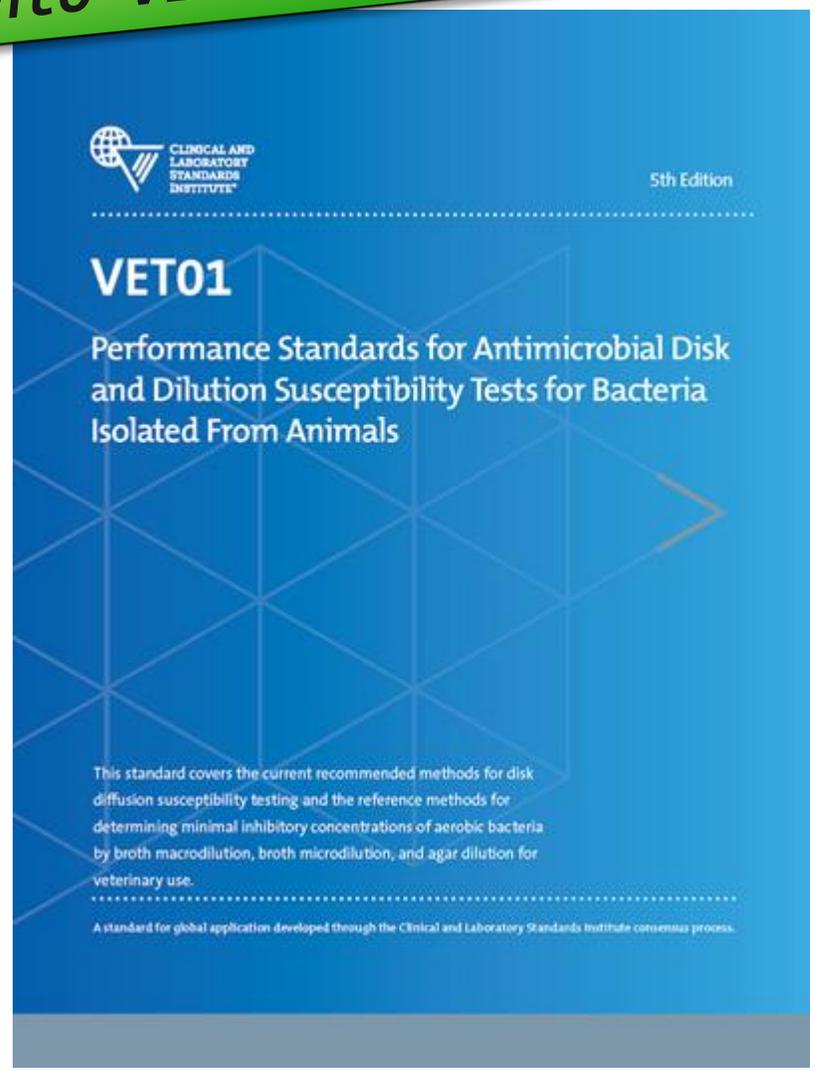
Febrero 2022

**Vigencia:
Sólo 2022!**

**TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS**

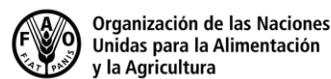
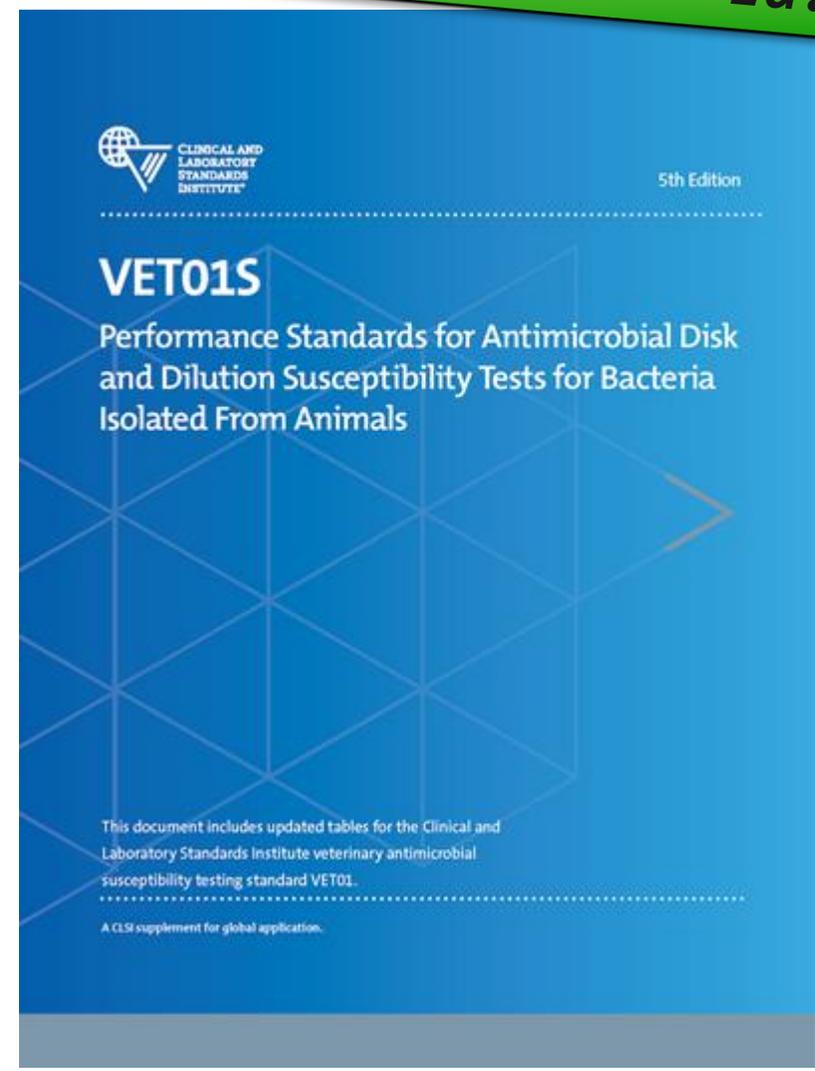


Documento VET01 5° Ed. (2018)

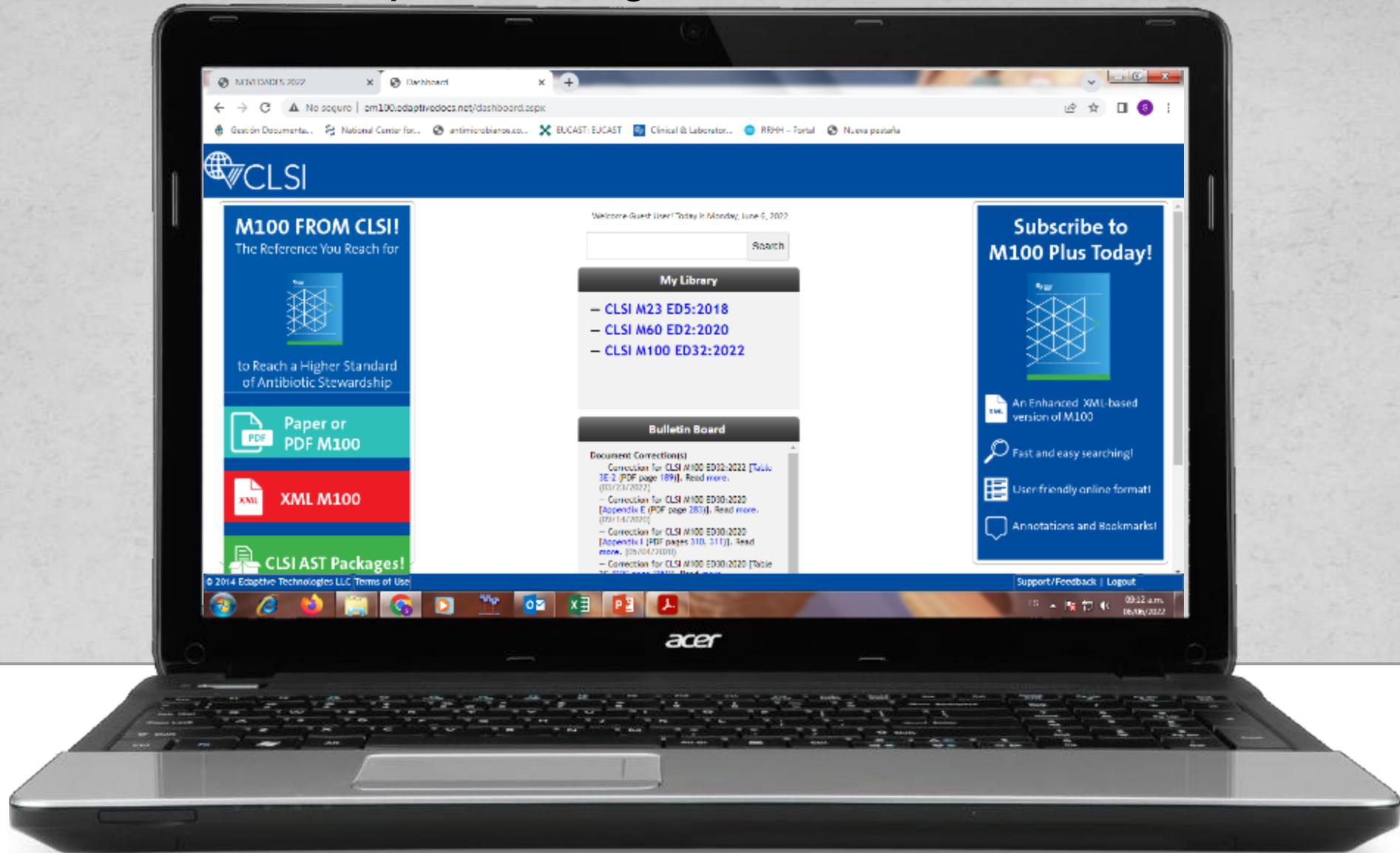


TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS

Documento VET01S 5° Ed. (2020)



<https://clsi.org/all-free-resources/>



Método de Difusión por Discos

Aplicable a bacterias aerobias o anaerobias facultativas de crecimiento rápido

- ✓ Enterobacterales. (Tabla 2A, M100)
- ✓ *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. (Tablas 2B-1 y 2B-2, M100)
- ✓ *Burkholderia cepacia* complex y *S. maltophilia* (Tablas 2B-3 y 2B-4, M100)
- ✓ *Staphylococcus* spp. (Tabla 2C, M100)
- ✓ *Enterococcus* spp. (Tabla 2D, M100)

Con modificaciones:

- ✓ *Haemophilus influenzae* y *H. parainfluenzae* (Tabla 2E, M100)
- ✓ *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis* (Tablas 2F y 2I, M100)
- ✓ *Streptococcus pneumoniae* (Tabla 2G, M100)
- ✓ *Streptococcus* spp. grupo β - hemolítico y grupo Viridans (Tablas 2H-1 y 2H-2, M100)

Categorías de Interpretación

-Sensible (S): el microorganismo es inhibido por las concentraciones del antimicrobiano que usualmente se alcanzan cuando se usa la dosificación recomendada para el tratamiento del sitio de infección, lo que resulta en una probable eficacia clínica.

-Intermedio (I): aislamientos con CIMes o diámetros de zona de inhibición que logran niveles generalmente alcanzables de droga en sangre y tejidos y/o cuyas tasas de respuesta puedan ser mas bajas que para aislamientos sensibles. Esta categoría también incluye una zona buffer, que contempla la variabilidad inherente al método, y debería prevenir que factores técnicos pequeños y no controlados causen grandes discrepancias en la interpretación, especialmente para drogas con estrecho margen de farmacotoxicidad.

-Resistente (R): el microorganismo no es inhibido por las concentraciones del antimicrobiano que usualmente se alcanzan cuando se usa la dosificación normal y/o presenta CIMes o diámetros de zona de inhibición dentro del rango en el que son probables los mecanismos de resistencia, y la eficacia clínica del antimicrobiano contra el microorganismo no se ha demostrado de forma confiable en estudios clínicos.

Categorías de Interpretación



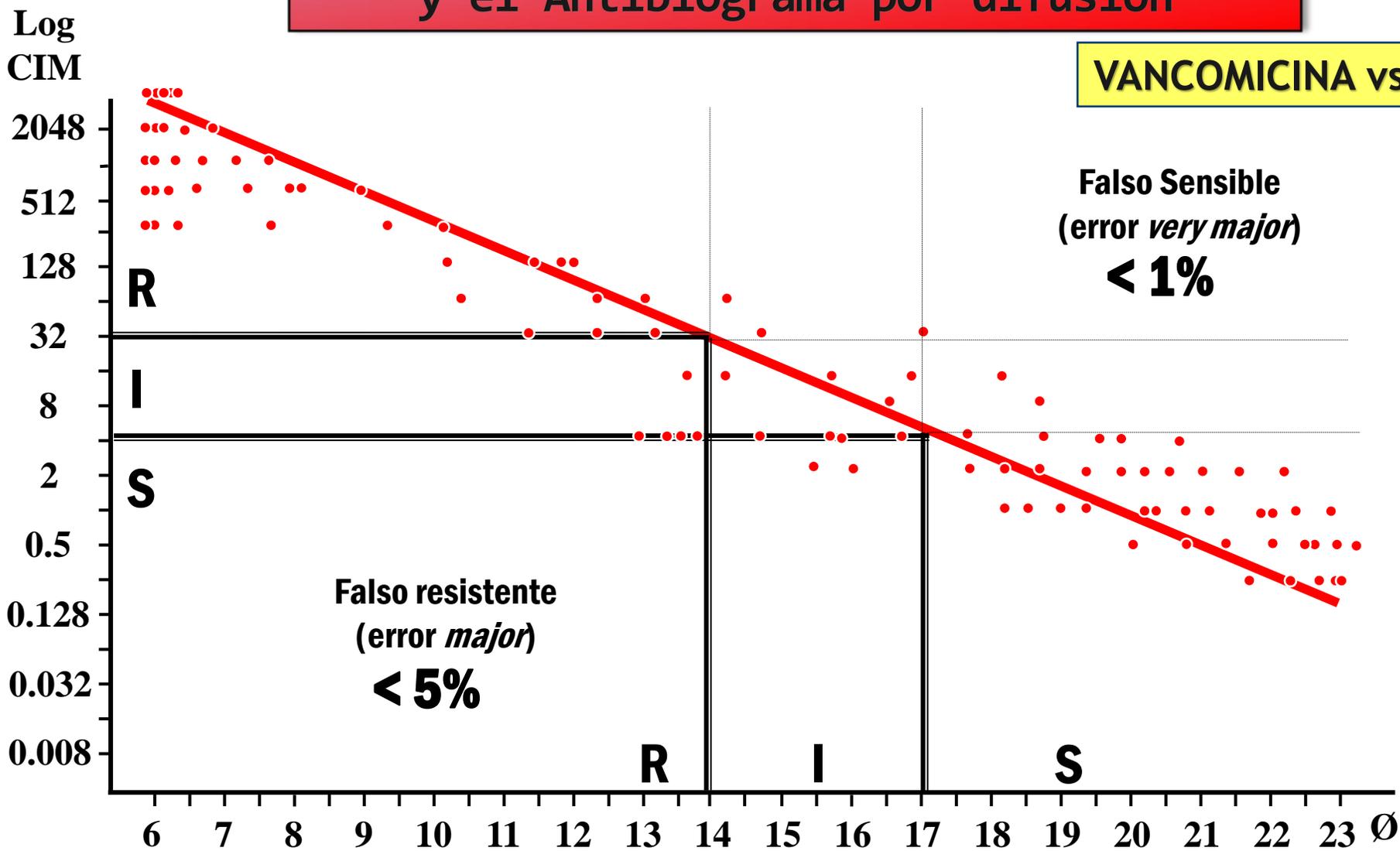
-No Sensible (NS): Se aplica a microorganismos que tienen sólo categoría “S”, debido a la ausencia o baja frecuencia de cepas resistentes. Los aislamientos con CIMs mayores o zonas de inhibición menores al BP de “S”, se deben informar como “No Sensibles”. “NS” no implica necesariamente que exista un mecanismo de resistencia. Es probable que cepas con CIMs por encima del punto de corte de sensibilidad se encuentren dentro de la distribución salvaje. Para cepas con resultados en la categoría “NS” se debería confirmar la identificación del organismo y las pruebas de sensibilidad.

-Sensible dependiente de la dosis (SDD): La sensibilidad de un aislamiento es dependiente del régimen de dosificación que se utilice. Cuando las pruebas de sensibilidad (CIM o difusión) determinen que la categoría de interpretación es SDD, será necesario utilizar un régimen de dosificación que resulte en una mayor exposición a la droga que el que se utilizó para establecer los puntos de corte.

Siempre considerando el máximo régimen de dosificación aprobado.

Relación entre el "gold standard" (CIM) y el Antibiograma por difusión

VANCOMICINA vs *Enterococcus* spp.



TRABAJANDO JUNTOS PARA COMBATIR LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS

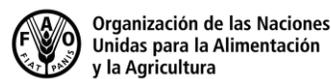


Table 2A
Enterobacteriaceae
M02 and M07

Table 2A. Zone Diameter and MIC Breakpoints for *Enterobacteriaceae*

<p>Testing Conditions</p> <p>Medium: Disk diffusion: MHA Broth dilution: CAMHB Agar dilution: MHA</p> <p>Inoculum: Broth culture method or colony suspension, equivalent to a 0.5 McFarland standard</p> <p>Incubation: 35°C ± 2°C; ambient air Disk diffusion: 16–18 hours Dilution methods: 16–20 hours</p>	<p>Routine QC Recommendations (see Tables 4A-1 and 5A-1 for acceptable QC ranges)</p> <p><i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853 (for carbapenems)</p> <p>Refer to Tables 4A-2 and 5A-2 to select strains for routine QC of β-lactam combination agents.</p> <p>When a commercial test system is used for susceptibility testing, refer to the manufacturer's instructions for QC test recommendations and QC ranges.</p>
---	---

* ATCC® is a registered trademark of the American Type Culture Collection.

Refer to Tables 3A, 3B, and 3C for additional testing, reporting, and QC for *Enterobacteriaceae*.

General Comments

- (1) For disk diffusion, test a maximum of 12 disks on a 150-mm plate and no more than 6 disks on a 100-mm plate; disks should be placed no less than 24 mm apart, center to center (see M02,¹ Subchapter 3.6). Each zone diameter should be clearly measurable; overlapping zones prevent accurate measurement. Measure the diameter of the zones of complete inhibition (as judged by the unaided eye), including the diameter of the disk. Hold the Petri plate a few inches above a black background illuminated with reflected light. The zone margin should be considered the area showing no obvious, visible growth that can be detected with the unaided eye. Ignore faint growth of tiny colonies that can be detected only with a magnifying lens at the edge of the zone of inhibited growth. Strains of *Proteus* spp. may swarm into areas of inhibited growth around certain antimicrobial agents. With *Proteus* spp., ignore the thin veil of swarming growth in an otherwise obvious zone of growth inhibition. With trimethoprim and the sulfonamides, antagonists in the medium may allow some slight growth; therefore, disregard slight growth (20% or less of the lawn of growth) and measure the more obvious margin to determine the zone diameter.
- (2) When fecal isolates of *Salmonella* and *Shigella* spp. are tested, only ampicillin, a fluoroquinolone, and trimethoprim-sulfamethoxazole should be reported routinely. In addition, for extraintestinal isolates of *Salmonella* spp., a 3rd-generation cephalosporin should be tested and reported, and chloramphenicol may be tested and reported if requested. Susceptibility testing is indicated for typhoidal *Salmonella* (*S. Typhi* and *S. Paratyphi A–C*) isolated from extraintestinal and intestinal sources. Routine susceptibility testing is not indicated for nontyphoidal *Salmonella* spp. isolated from intestinal sources. In contrast, susceptibility testing is indicated for all *Shigella* isolates.
- (3) The dosage regimens shown in the comments column below are those needed to achieve plasma drug exposures (in adults with normal renal and hepatic functions) on which breakpoints were based. When implementing new breakpoints, it is strongly recommended that laboratories share this information with infectious diseases practitioners, pharmacists, pharmacy and therapeutics committees, infection control committees, **and the antimicrobial stewardship team.**

NOTE: Information in boldface type is new or modified since the previous edition.

Table 2A
Enterobacterales
M02 and M07

Table 2A. Enterobacterales (Continued)

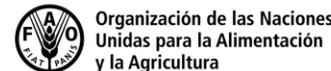
Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Interpretive Categories and Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm				Interpretive Categories and MIC Breakpoints, µg/mL				Comments
			S	SDD	I	R	S	SDD	I	R	
PENICILLINS											
A	Ampicillin	10 µg	≥ 17	-	14-16*	≤ 13	≤ 8	-	16*	≥ 32	(6) Results of ampicillin testing can be used to predict results for amoxicillin. See general comment (2).
O	Piperacillin	100 µg	≥ 21	-	18-20*	≤ 17	≤ 16	-	32-64*	≥ 128	
O	Mecillinam	10 µg	≥ 15	-	12-14*	≤ 11	≤ 8	-	16*	≥ 32	(7) For testing and reporting of <i>E. coli</i> urinary tract isolates only.
B-LACTAM COMBINATION AGENTS											
B	Amoxicillin-clavulanate	20/10 µg	≥ 18	-	14-17*	≤ 13	≤ 8/4	-	16/8*	≥ 32/16	
B	Ampicillin-sulbactam	10/10 µg	≥ 15	-	12-14*	≤ 11	≤ 8/4	-	16/8*	≥ 32/16	
B	Ceftolozane-tazobactam	30/10 µg	≥ 21	-	18-20*	≤ 17	≤ 2/4	-	4/4*	≥ 8/4	(8) Breakpoints are based on a dosage regimen of 1.5 g administered every 8 h.
B	Ceftazidime-avibactam	30/20 µg	≥ 21	-	-	≤ 20	≤ 8/4	-	-	≥ 16/4	(9) Breakpoints are based on a dosage regimen of 2.5 g every 8 h administered over 2 h. (10) Confirmatory MIC testing is indicated for isolates with zones of 20-22 mm to avoid reporting false-susceptible or false-resistant results.
B	Imipenem-relebactam	10/25 µg	≥ 25	-	21-24*	≤ 20	≤ 1/4	-	2/4*	≥ 4/4	(11) Breakpoints are based on a dosage regimen of 1.25 g administered every 6 h. (12) Breakpoints do not apply to the family <i>Morganellaceae</i> , which includes but is not limited to the genera <i>Morganella</i> , <i>Proteus</i> , and <i>Providencia</i> . (13) Organisms that test susceptible to imipenem are also considered susceptible to imipenem-relebactam. However, organisms that test susceptible to imipenem-relebactam cannot be assumed to be susceptible to imipenem.

Enterobacteriales:

Tablas: M100 CLSI
32ª Edición (2022)

- TABLA 3A: Test para β -lactamasas de espectro extendido en *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* y *P. mirabilis*
- TABLA 3B: Prueba de Carba NP para Enterobacteriales y *P. aeruginosa* sospechosas de producción de carbapenemasa
- TABLA 3B-1: Modificaciones de Tabla 3B usando puntos de corte para carbapenemes de M100-S20, enero 2010
- TABLA 3C: Método de Inactivación de Carbapenem modificado (mCIM) para Enterobacteriales y *P. aeruginosa* sospechosas de producción de carbapenemasa
- TABLA 3C-1: Modificaciones de Tabla 3C usando puntos de corte para carbapenemes de M100-S20, enero 2010
- TABLA 3D: Test para detección de resistencia a colistín en Enterobacteriales y *P. aeruginosa*
- TABLA 3E: Test para realizar Difusión por Discos directamente de hemocultivo positivo

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



Staphylococcus spp.:

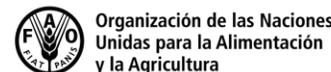
Tablas: M100 CLSI
32º Edición (2022)

- TABLA 3F: Test para detección de producción de β -lactamasa en *Staphylococcus* spp.
- TABLA 3G-1: Test para detección de Meticilino resistencia (resistencia a oxacilina) en *S. aureus* y *S. lugdunensis*
- TABLA 3G-2: Test para detección de Meticilino resistencia (resistencia a oxacilina) en *Staphylococcus* spp. excepto *S. aureus* y *S. lugdunensis*
- TABLA 3H: Screening para detección de CIM ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ de Vancomicina en *S. aureus* y *Enterococcus* spp.
- TABLA 3I: Test para detección de resistencia inducible a clindamicina en *Staphylococcus* spp, *S. pneumoniae* y *Streptococcus* spp grupo β -hemolítico.
- TABLA 3J: Test para detección de alto nivel de resistencia a mupirocina en *S. aureus*.

Enterococcus spp.:

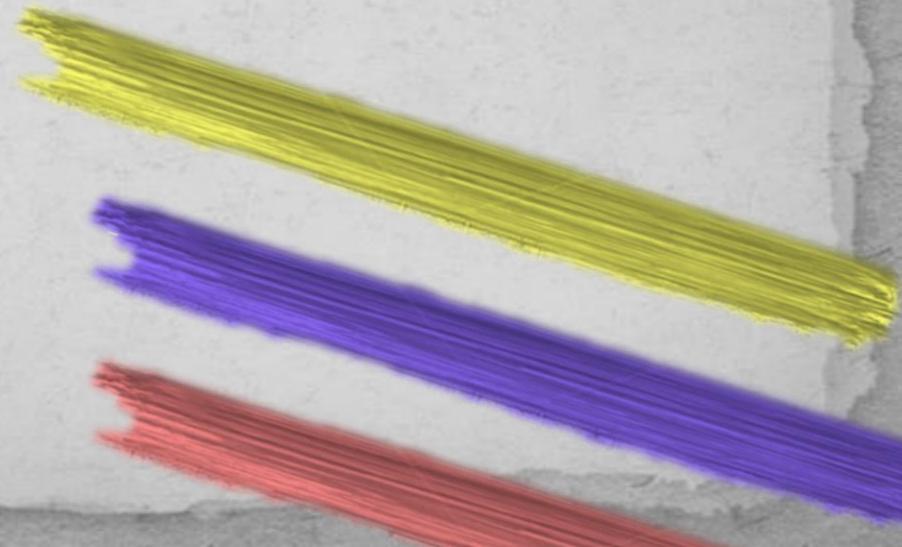
- TABLA 3K: Test para detección de alto nivel de resistencia a aminoglucósidos en *Enterococcus* spp.

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



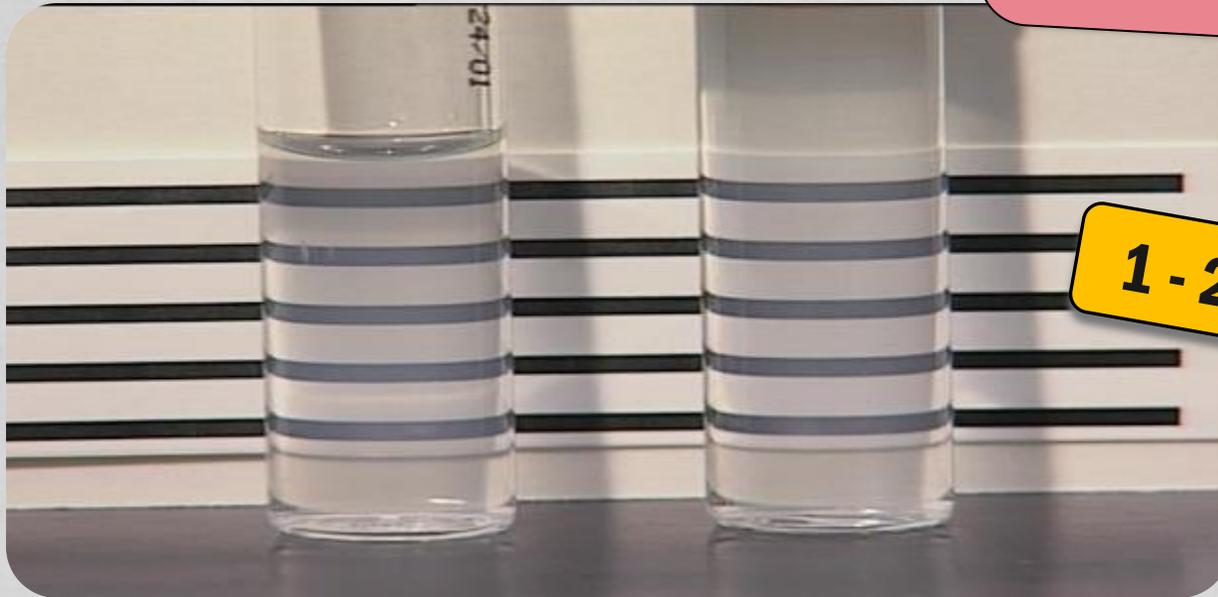
Método de Difusión por Discos

- 1. Preparación y estandarización del inóculo**
- 2. Inoculación de placas**
- 3. Aplicación de discos**
- 4. Incubación**
- 5. Medida de las zonas de inhibición**
- 6. Interpretación de resultados**
- 7. Control de calidad**



1. Estandarización del inóculo

PATRON DE TURBIDEZ
0.5 de 1a ESCALA
Mc. FARLAND:



1 - 2 x 10⁸ UFC/ml

0,5 ml BaCl₂ 1.175% + 99,5 ml de H₂SO₄ 1%
(Absorbancia a 625 nm: 0.08 a 0.10)

1. Preparación del inóculo estandarizado: 0.5 de la ESCALA Mc. FARLAND

MÉTODO de SUSPENSIÓN de COLONIA:

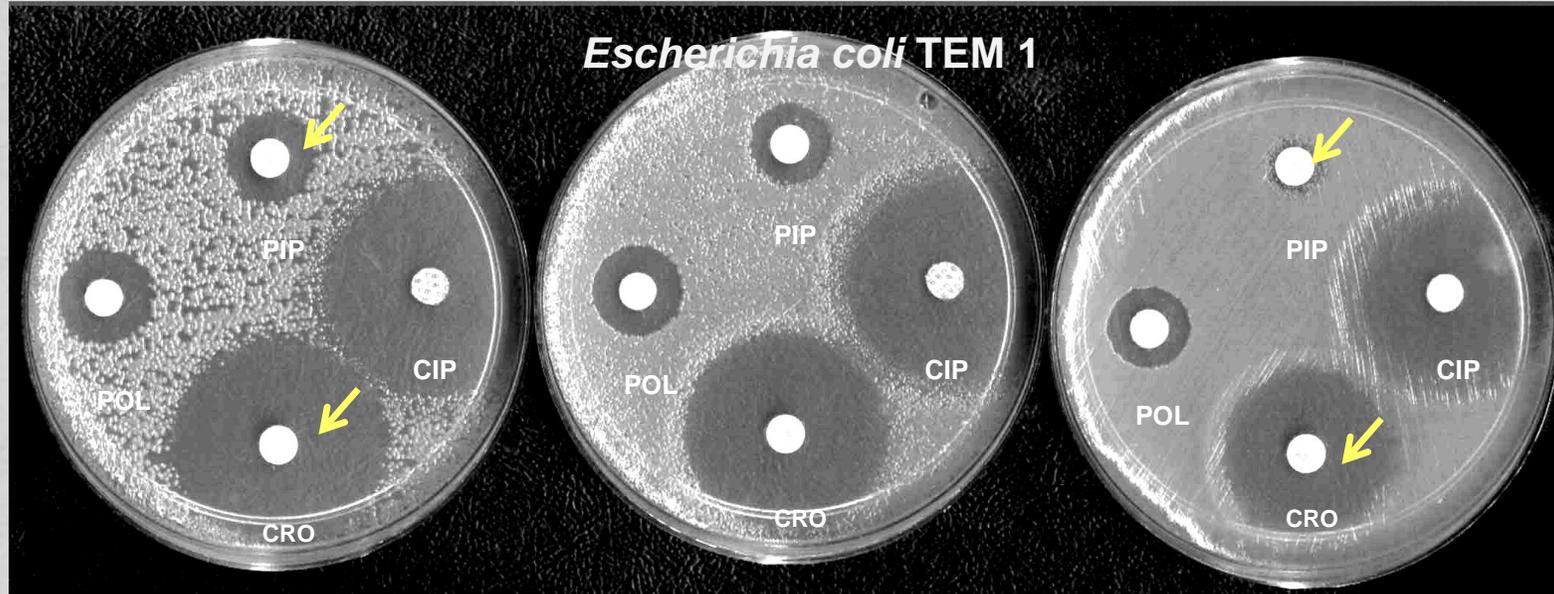
- Cepas con 18-24 hs de incubación.
- *Staphylococcus* spp. y detección de Meticilino-Resistencia
- Microorg. fastidiosos : *S. pneumoniae* , *Streptococcus* spp., *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis*.



MÉTODO de CULTIVO en CALDO:

- Se dispone de pocas colonias.
- Cepas con mas de 24 horas de incubación.
- Bacterias con dificultad para obtener suspensiones homogéneas.

EFEKTO INOKULO



0,25 Mc Farland
 7×10^7 UFC/ml

0,5 Mc Farland
 1.5×10^8 UFC/ml

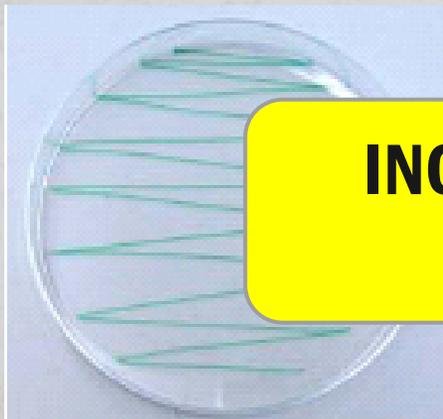
1 Mc Farland
 3×10^8 UFC/ml

2. Inoculación de las placas

- ✓ Agar Mueller Hinton (MH)
- ✓ Agar MH + 5% sangre de carnero, HTM, etc.
- ✓ pH 7.2 - 7.4
- ✓ Profundidad de las placas: 4 mm



Hisopar en tres direcciones



Hisopar



Rotar 60°, hisopar



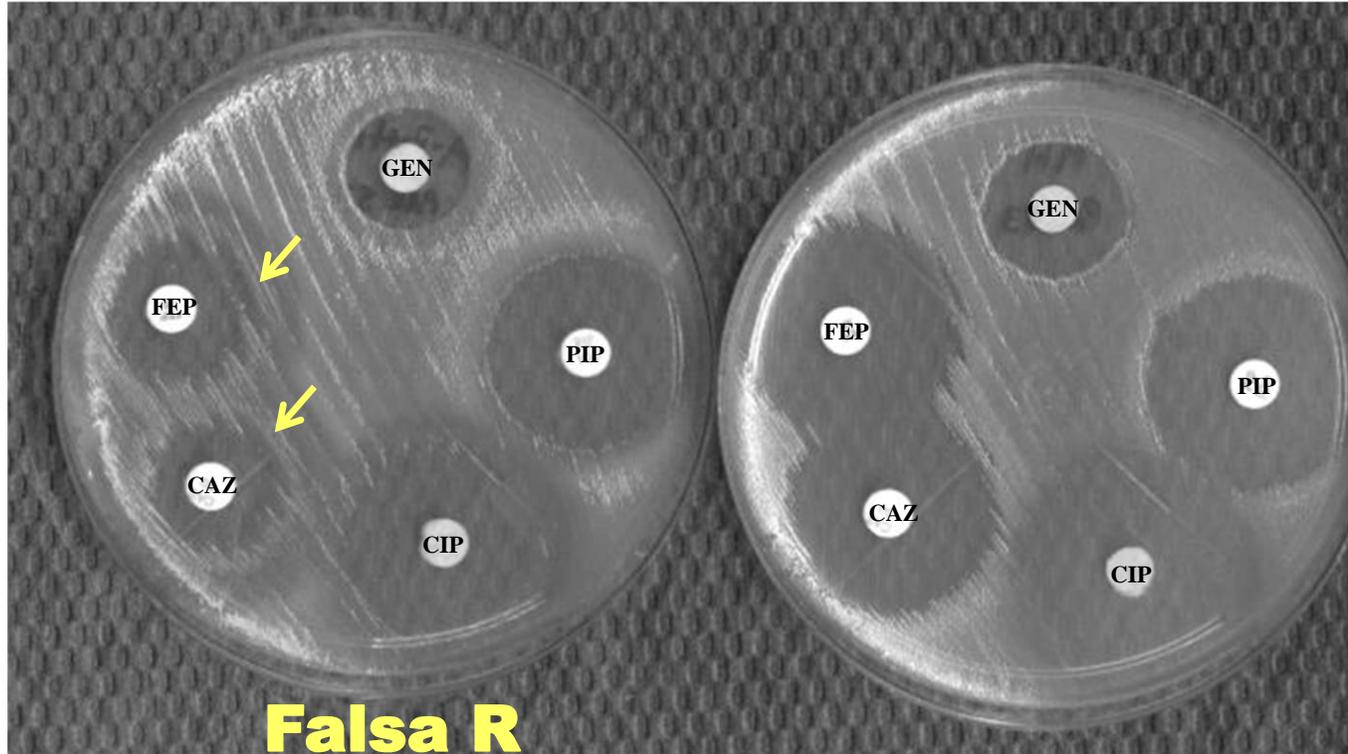
Rotar 60°, hisopar

INOCULAR DENTRO DE LOS 15 min. DE ESTANDARIZADO EL INOCULO

Variación en el medio de cultivo
P. aeruginosa ATCC 27853

Agar BHI

Agar MH



3. Aplicación de discos

- ✓ **Verificar el vencimiento**
- ✓ **Evitar humedad**
- ✓ **Conservar a 4 °C o menos**
- ✓ **No usar mas de 6 discos por placa de 100 mm.**
- ✓ **No usar mas de 12 discos por placa de 150 mm.**

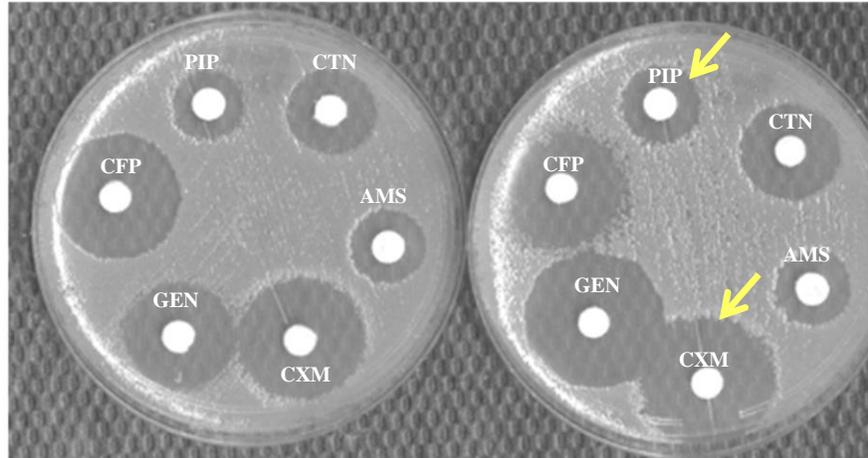


**APLICAR LOS DISCOS DENTRO DE LOS 15 min.
POSTERIORES A LA INOCULACION**

Variación en el tiempo de colocación de los discos

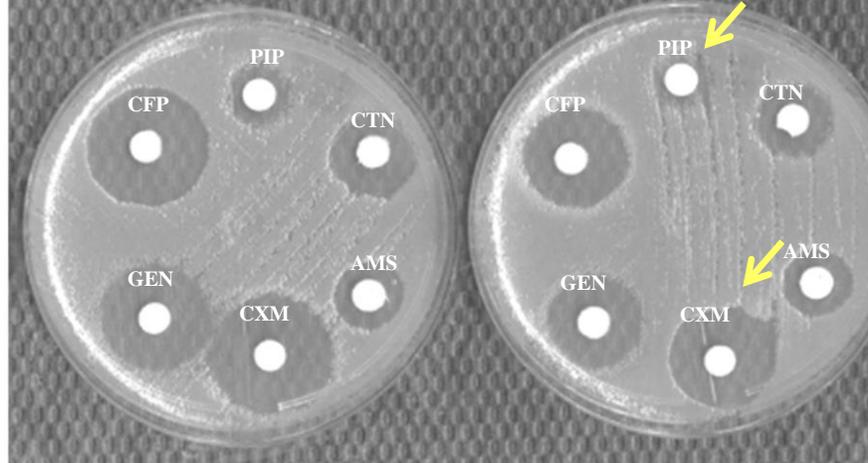
Escherichia coli ATCC 35218

1 hs



0 hs

2 hs



3 hs

Falsa R (a mayor demora en la colocación)

4. Incubación de placas



**INCUBAR LAS PLACAS DENTRO DE LOS 15 min. DE
COLOCADOS LOS DISCOS**

Efecto de la Temperatura de Incubación *Staphylococcus* spp. y Meticilino Resistencia

Table 2C
Staphylococcus spp.
M02 and M07

Table 2C. Zone Diameter and MIC Breakpoints for *Staphylococcus* spp.

Testing Conditions	Routine QC Recommendations (see Tables 4A-1 and 5A-1 for acceptable QC ranges)
<p>Medium: Disk diffusion: MHA Broth dilution: CAMHB; CAMHB + 2% NaCl for oxacillin; CAMHB supplemented to 50 µg/mL calcium for daptomycin Agar dilution: MHA; MHA + 2% NaCl for oxacillin. Agar dilution has not been validated for daptomycin.</p> <p>Inoculum: Colony suspension, equivalent to a 0.5 McFarland standard</p> <p>Incubation: 35°C ± 2°C; ambient air Disk diffusion: 16–18 hours; 24 hours (CoNS and cefoxitin) Dilution methods: 16–20 hours; 24 hours for oxacillin and vancomycin.</p> <p>Testing at temperatures above 35°C may not detect MRS.</p>	<p>Disk diffusion: <i>S. aureus</i> ATCC® 25923</p> <p>Dilution methods: <i>S. aureus</i> ATCC® 29213</p> <p>When a commercial test system is used for susceptibility testing, refer to the manufacturer's instructions for QC test recommendations and QC ranges.</p>

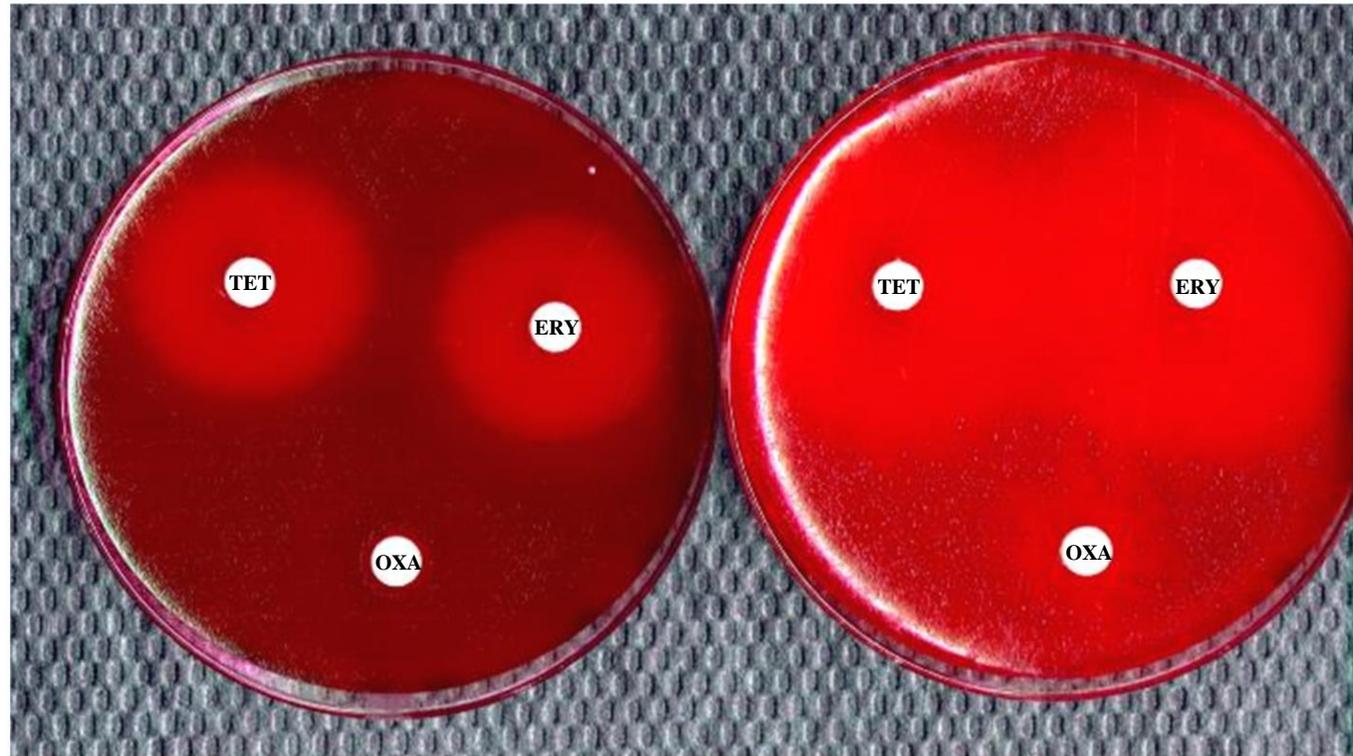
* ATCC® is a registered trademark of the American Type Culture Collection.

General Comments

- (1) For disk diffusion, test a maximum of 12 disks on a 150-mm plate and no more than 6 disks on a 100-mm plate; disks should be placed no less than 24 mm apart, center to center (see M02,¹ Subchapter 3.6). Each zone diameter should be clearly measurable; overlapping zones prevent accurate measurement. Measure the diameter of the zones of complete inhibition (as judged by the unaided eye), including the diameter of the disk. Hold the Petri plate a few inches above a black background illuminated with reflected light, except for linezolid, which should be read with transmitted light (plate held up to light source). The zone margin should be considered the area showing no obvious, visible growth that can be detected with the unaided eye. Ignore faint growth of tiny colonies that can be detected only with a magnifying lens at the edge of the zone of inhibited growth. With trimethoprim and the sulfonamides, antagonists in the medium may allow some slight growth; therefore, disregard slight growth (20% or less of the lawn of growth) and measure the more obvious margin to determine the zone diameter. For linezolid, any discernible growth within the zone of inhibition is indicative of resistance to the respective agent.
- (2) For staphylococci when testing chloramphenicol, clindamycin, erythromycin, linezolid, tedizolid, and tetracycline by broth microdilution MIC, trailing growth can make end-point determination difficult. In such cases, read the MIC at the lowest concentration where the trailing begins. Tiny buttons of growth should be ignored (see M07,² Figures 3 and 4). With trimethoprim and the sulfonamides, antagonists in the medium may allow some slight growth; therefore, read the end point at the concentration in which there is ≥80% reduction in growth as compared to the control (see M07,² Figure 5).
- (3) Historically, resistance to the penicillinase-stable penicillins (see Glossary 1) has been referred to as "methicillin resistance" or "oxacillin resistance." MRSA are those strains of *S. aureus* that express *mecA* or another mechanism of methicillin resistance, such as changes in affinity of penicillin-binding proteins for oxacillin (modified *S. aureus* strains).

Las pruebas a temperaturas superiores a 35°C pueden no detectar la Meticilino Resistencia en Estafilococos

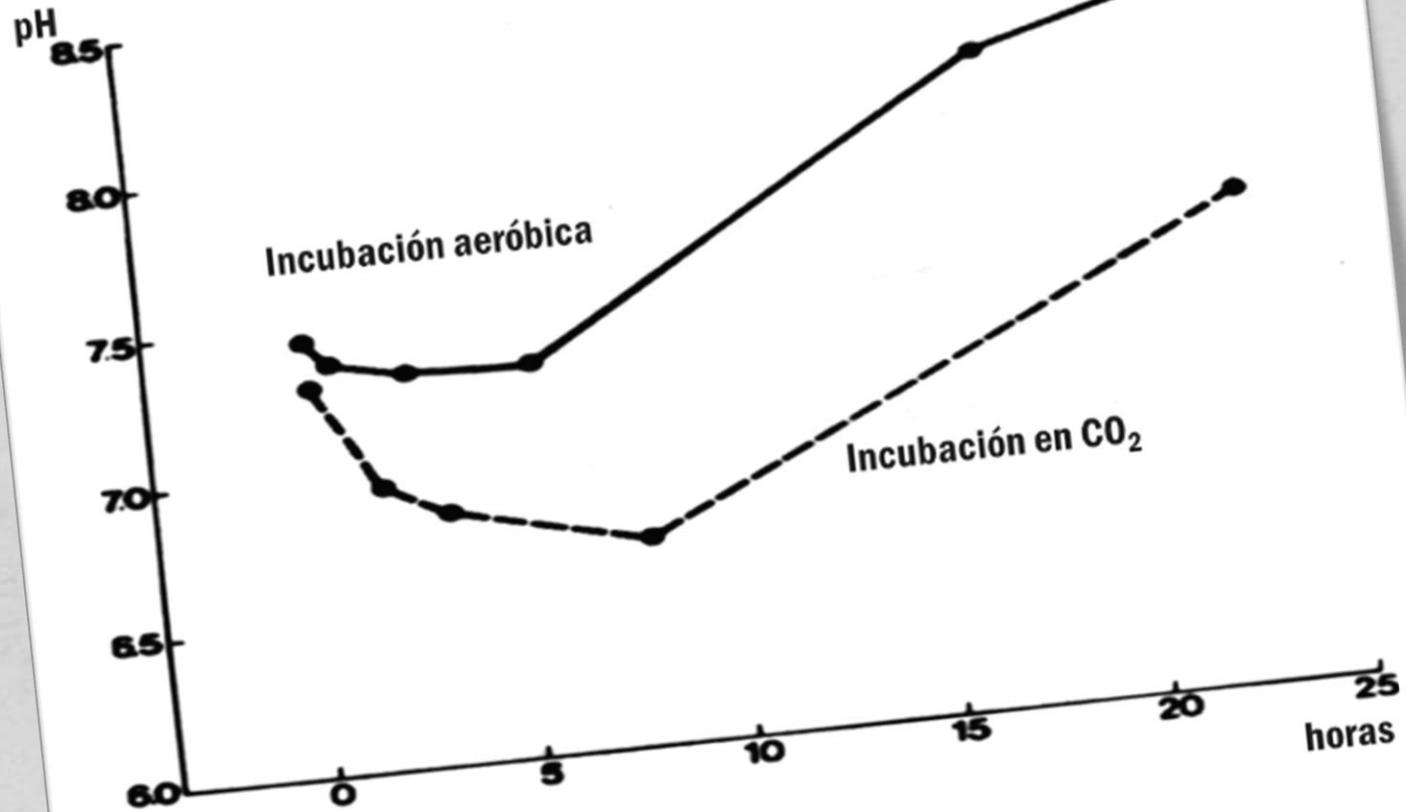
Variación en la atmósfera de incubación
***Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619**



CO₂

Aire

Condiciones de incubación y pH del agar



Casos particulares donde la lectura del antibiograma se hace a las 24 horas:

-*Staphylococcus aureus* (Tabla 3H): MUPIROCINA.

-*Staphylococcus* spp., excluyendo *S. aureus*, *S. lugdunensis*, *S. pseudintermedius* y *S. schleiferi* (Tabla 2C): CEFOXITINA.

-*Enterococcus* spp. (Tabla 2D): VANCOMICINA.

Table 3H
Test for High-Level Mupirocin Resistance in *Staphylococcus aureus*

Table 3H. Test for Detection of High-

Test	
Test method	
Organism group	<i>S. aureus</i>
Medium	MHA
Antimicrobial concentration	200-µg mupirocin
Inoculum	Standard disc
Incubation conditions	35°C ± 2°C; aerobic
Incubation length	24 hours
Results	Examine carefully for light growth visible. No zone = high level mupirocin resistance. Any zone = high level mupirocin resistance.

Table 2C
Staphylococcus spp.
M02 and M07

Table 2C. Zone Diameter and MIC Breakpoints for *Staphylococcus* spp.

Testing Conditions

Medium: Disk diffusion: MHA
Broth dilution: CAMHB; CAMHB + CAMHB supplemented to 50 µg/r
Agar dilution: MHA; MHA + 2% NaCl; has not been validated for daptomycin

Inoculum: Colony suspension, equivalent to standard

Incubation: 35°C ± 2°C; ambient air
Disk diffusion: 16–18 hours; 24 h
Dilution methods: 16–20 hours, 24 hours for oxacillin and vancomycin
Testing at temperatures above 30°C

Table 2D
Enterococcus spp.
M02 and M07

Table 2D. Zone Diameter and MIC Breakpoints for *Enterococcus* spp.

Testing Conditions

Medium: Disk diffusion: MHA
Broth dilution: CAMHB; CAMHB supplemented to 50 µg/mL calcium for daptomycin
Agar dilution: MHA; agar dilution has not been validated for daptomycin

Inoculum: Broth culture method or colony suspension, equivalent to a 0.5 McFarland standard

Incubation: 35°C ± 2°C; ambient air
Disk diffusion: 16–18 hours
Dilution methods: 16–20 hours
All methods: 24 hours for vancomycin

Routine QC Recommendations (see Tables 4A-1 and 5A-1 for acceptable QC ranges)

Disk diffusion:
S. aureus ATCC® 25923

Dilution methods:
E. faecalis ATCC® 29212

When a commercial test system is used for susceptibility testing, refer to the manufacturer's instructions for QC test recommendations and QC ranges.

5. Medida de las zonas de inhibición

- ✓ Crecimiento confluyente
- ✓ Zonas de inhibición uniformes y circulares

2018

 QUICK GUIDE
M02QG, 1st ed.



Disk Diffusion Reading Guide

6. Interpretación de resultados

- ✓ Documento M2-13^o Ed. CLSI (2018)
- ✓ Tablas M100 CLSI (2022)

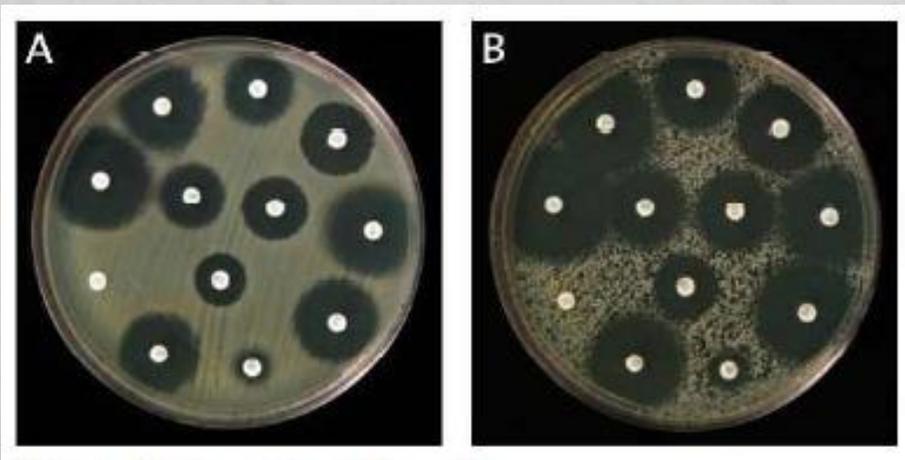
Medida de las zonas de inhibición

«Deberá tenerse en cuenta el área que no muestre desarrollo obvio a ojo desnudo, no incluyendo velo de crecimiento o pequeñas colonias que puedan ser detectadas solo con mucha dificultad en el borde de la zona de inhibición»

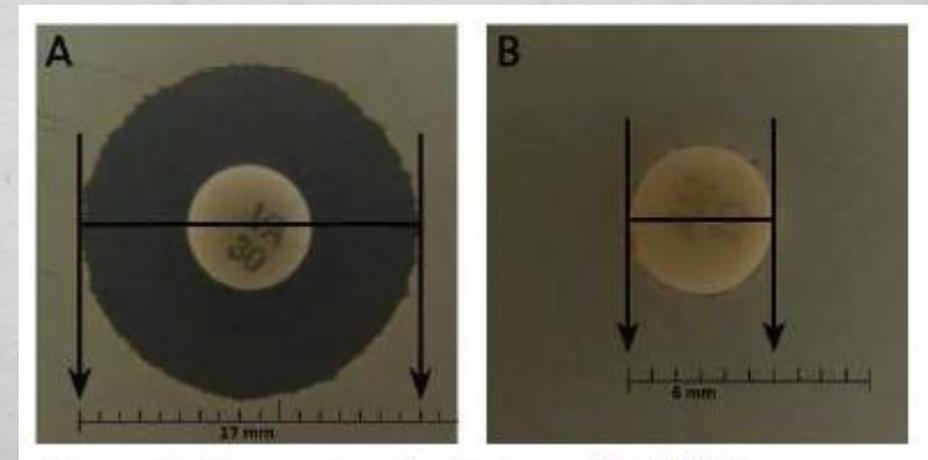
M02QG, 1º Ed.(2018)

Reglas Generales para la Medida de Zonas de Inhibición

1. EVALUAR EL CRECIMIENTO

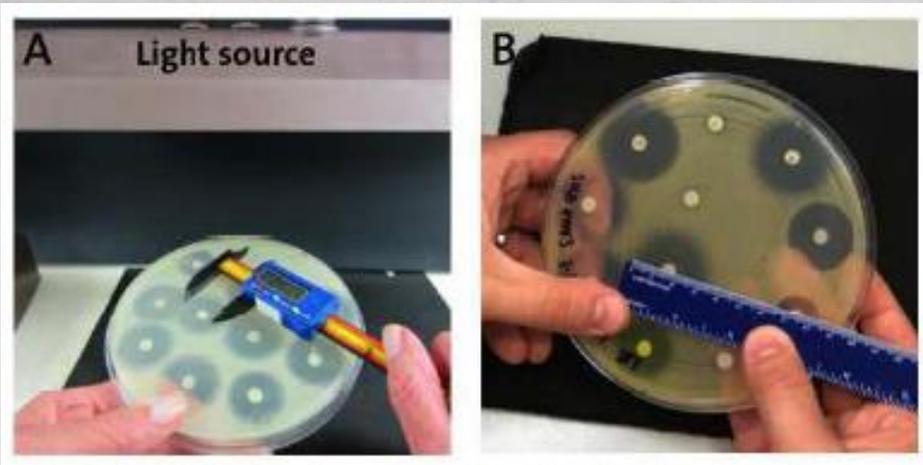


2. MEDIDA DE LA ZONA DE INHIBICION

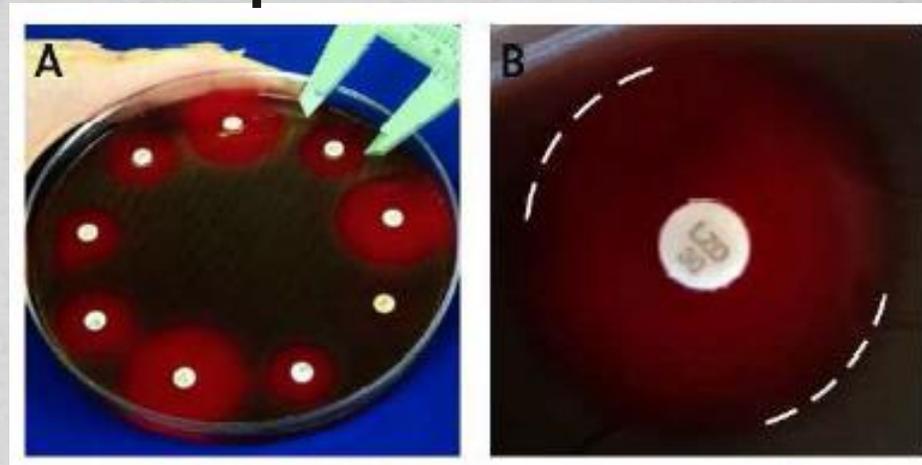


MEDIDA DE LA ZONA DE INHIBICION CON LUZ REFLEJADA

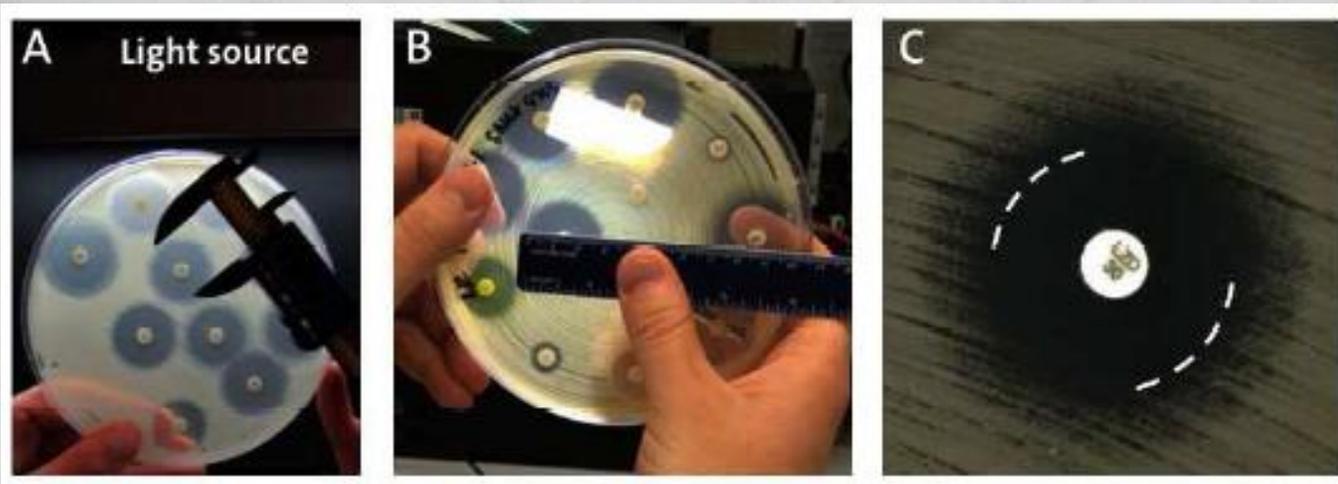
3. Medio translúcido



4. Medio opaco



5. MEDIDA DE LA ZONA DE INHIBICION CON LUZ TRANSMITIDA

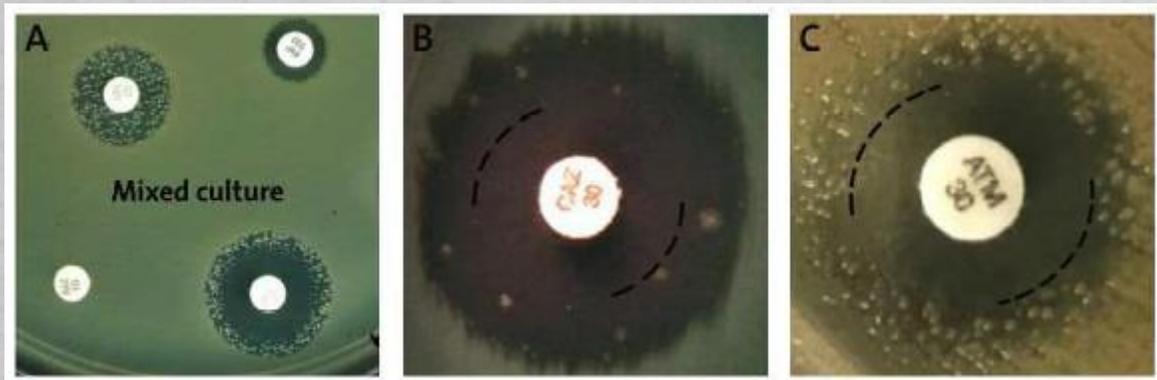


***-Staphylococcus* spp.:** linezolid (Tabla 2C) y mupirocina (Tabla 3H)

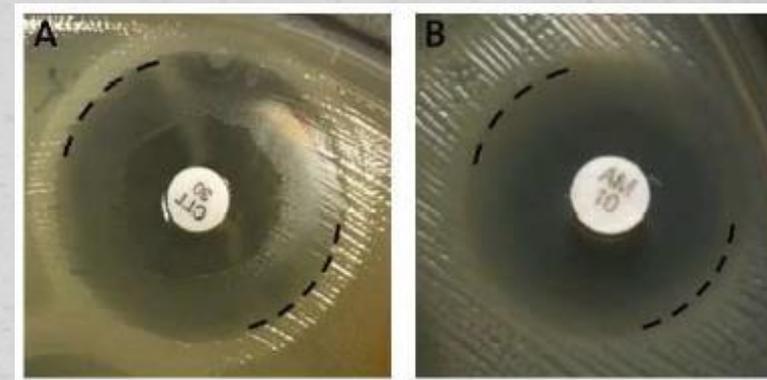
***-Enterococcus* spp.:** vancomicina (Tabla 2D)

Medida de Zonas de Inhibición en Situaciones Especiales

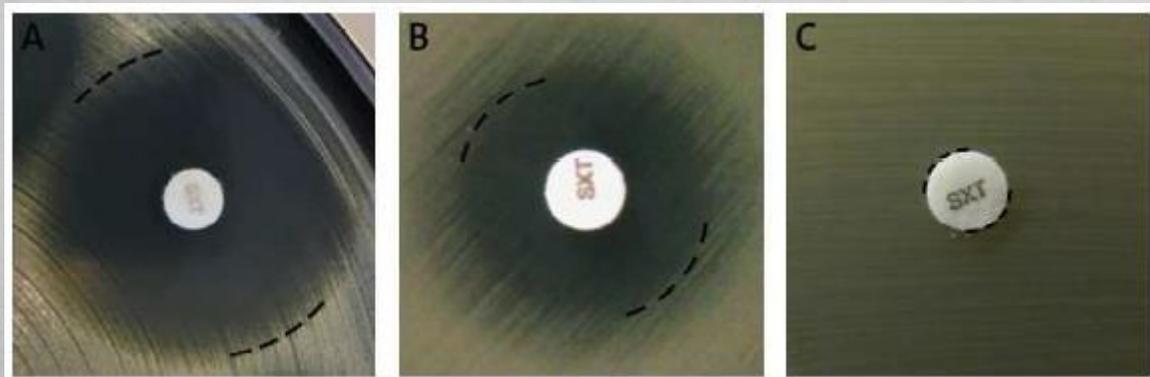
6. COLONIAS DENTRO DEL HALO DE INHIBICION



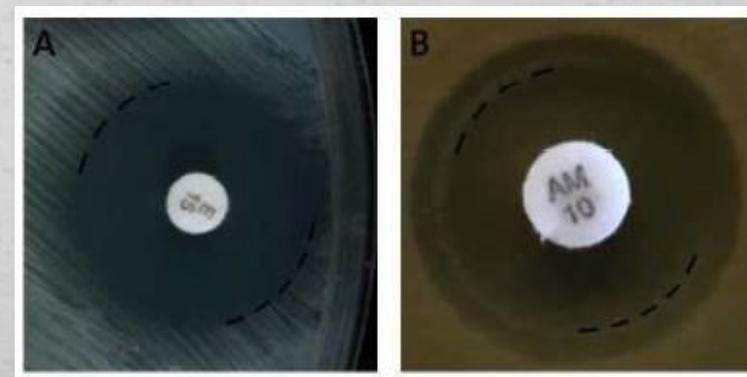
8. SWARMING



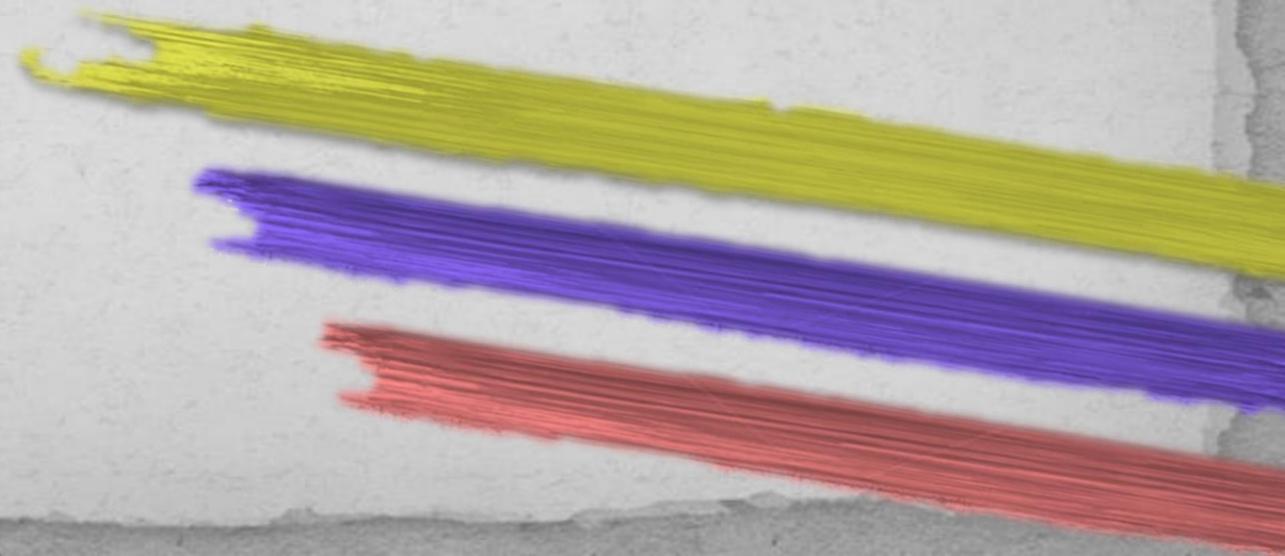
7. TRIMETROPIMA/SULFAMETOXAZOL



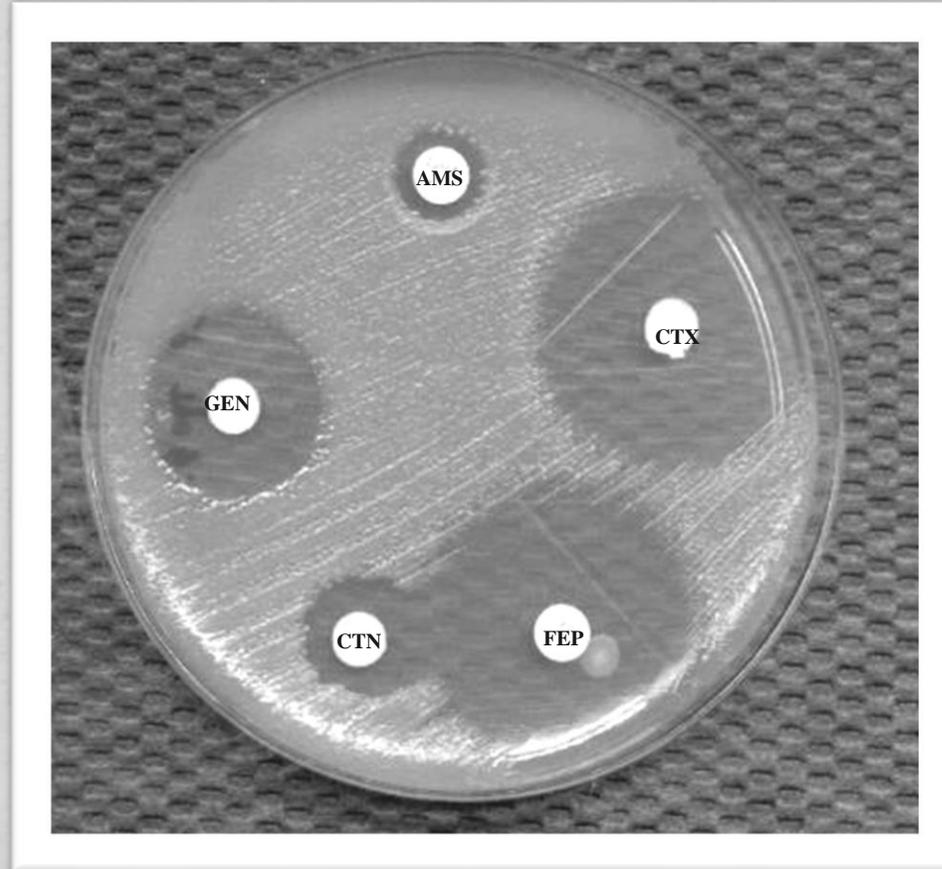
9. DOBLE HALO



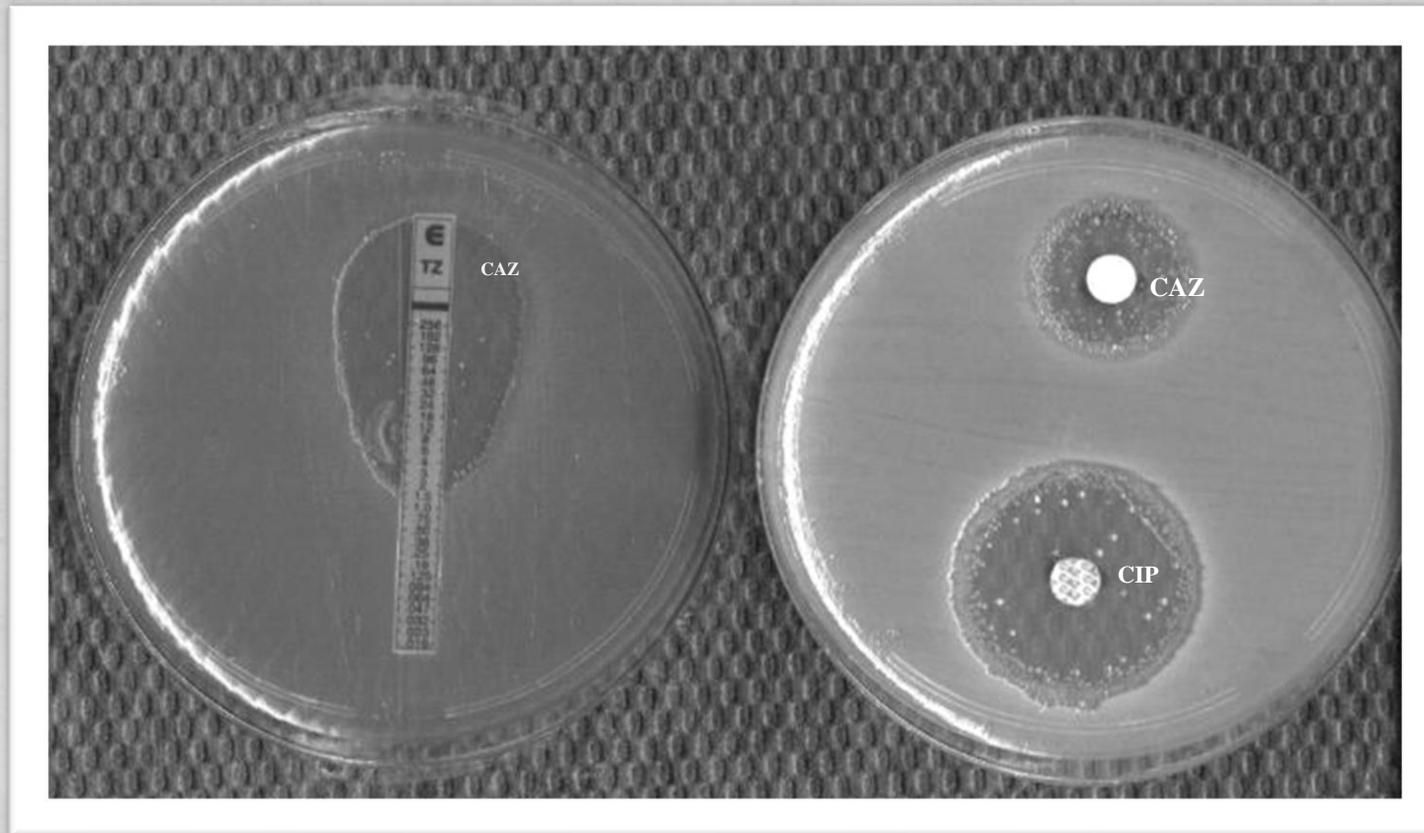
Utilidades



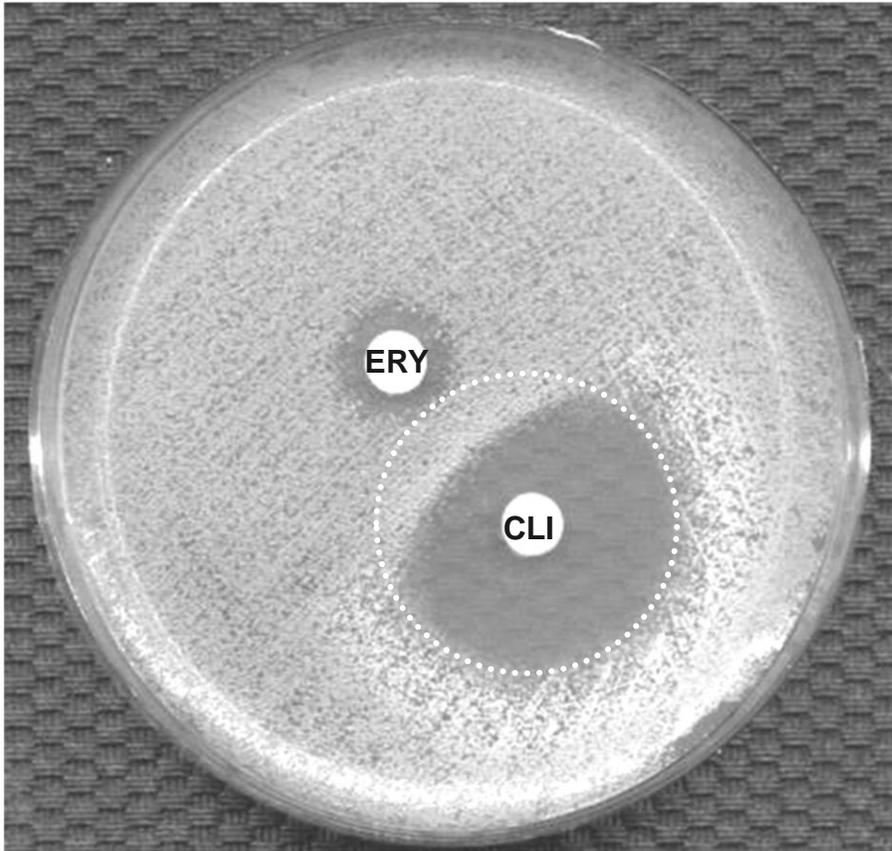
Contaminación del antibiograma
Escherichia coli



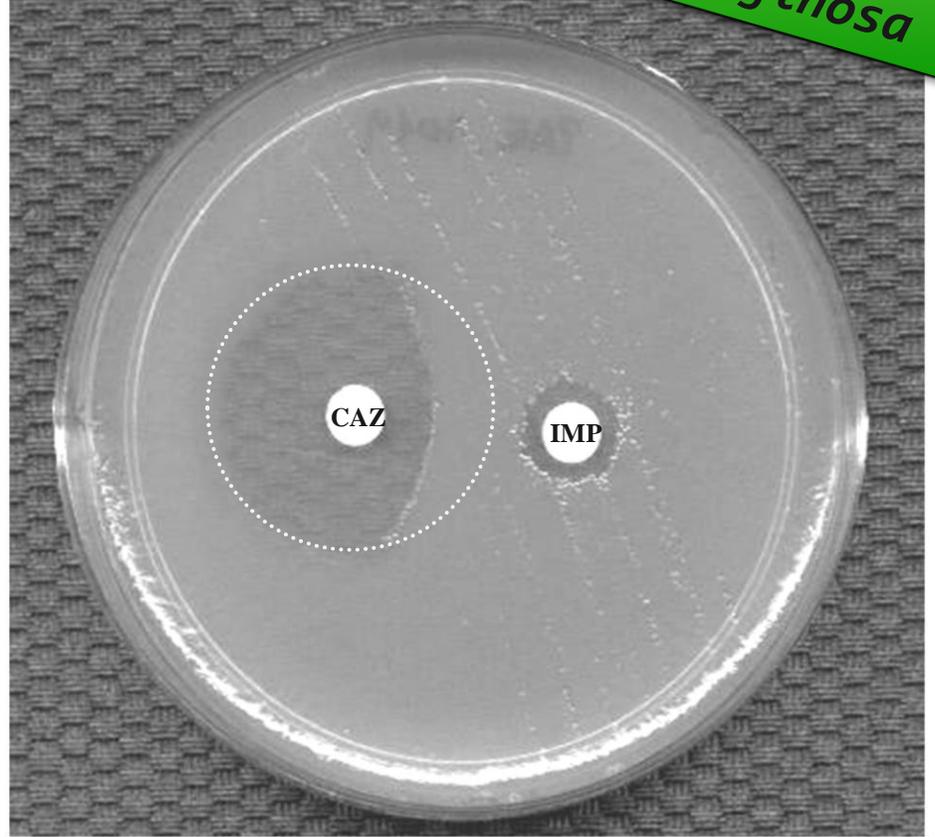
Selección de subpoblación resistente
Enterobacter cloacae



Mecanismo MLS inducible
Staphylococcus aureus

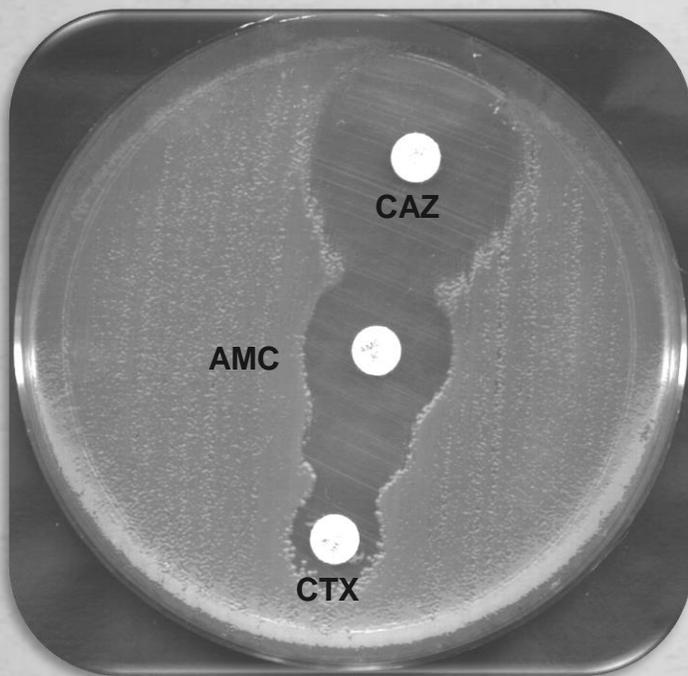


Inducción de Cefalosporinasa
Cromosómica
Pseudomonas aeruginosa



DETECCION DE β -lactamasas de Espectro Extendido
Inhibición con ácido clavulánico

E. coli CTX-M-2

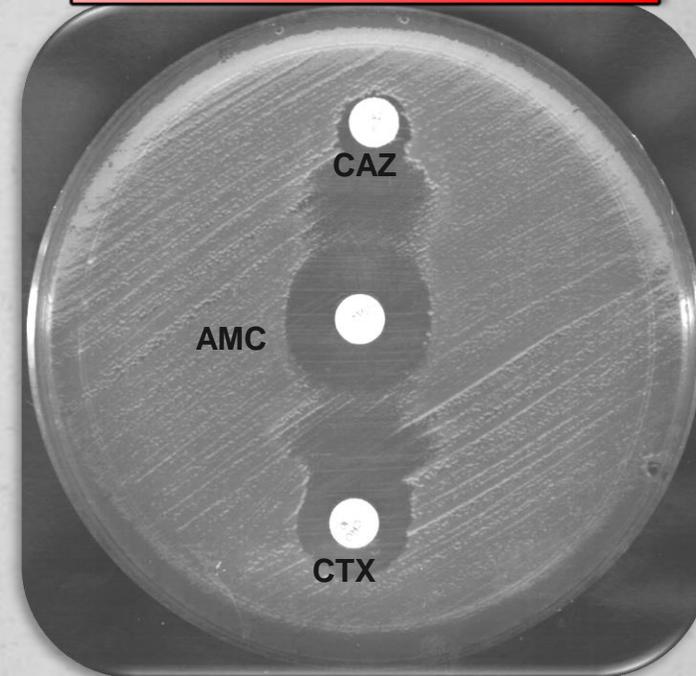


CAZ

AMC

CTX

E. coli PER-2

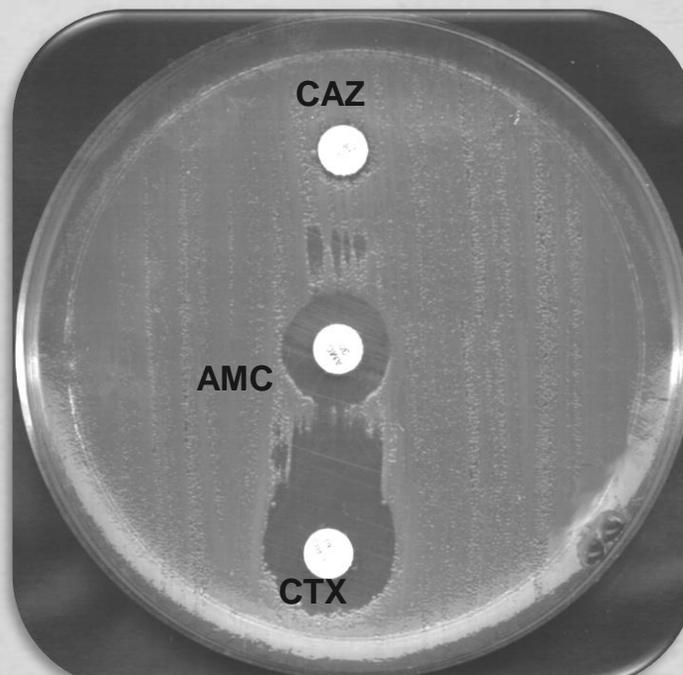


CAZ

AMC

CTX

E. coli SHV-5

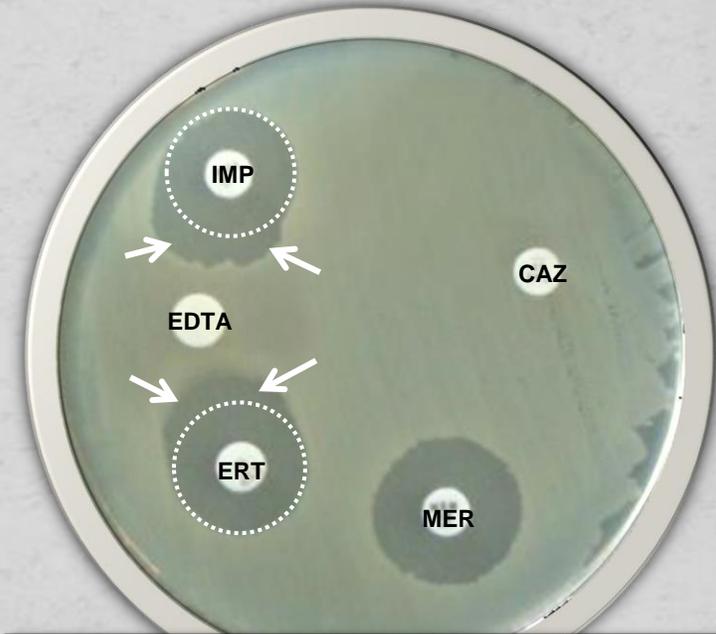
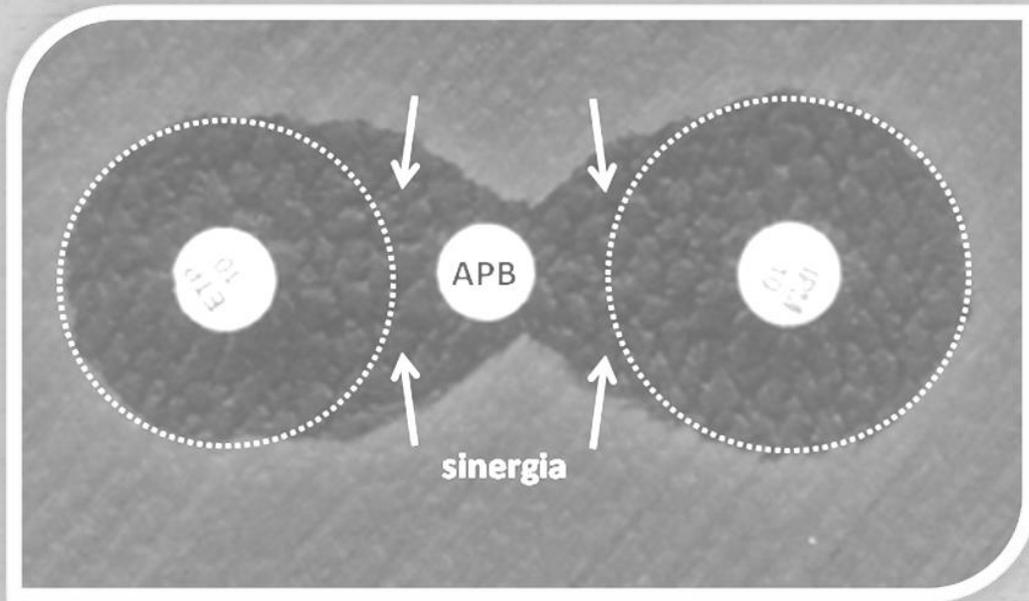


CAZ

CTX

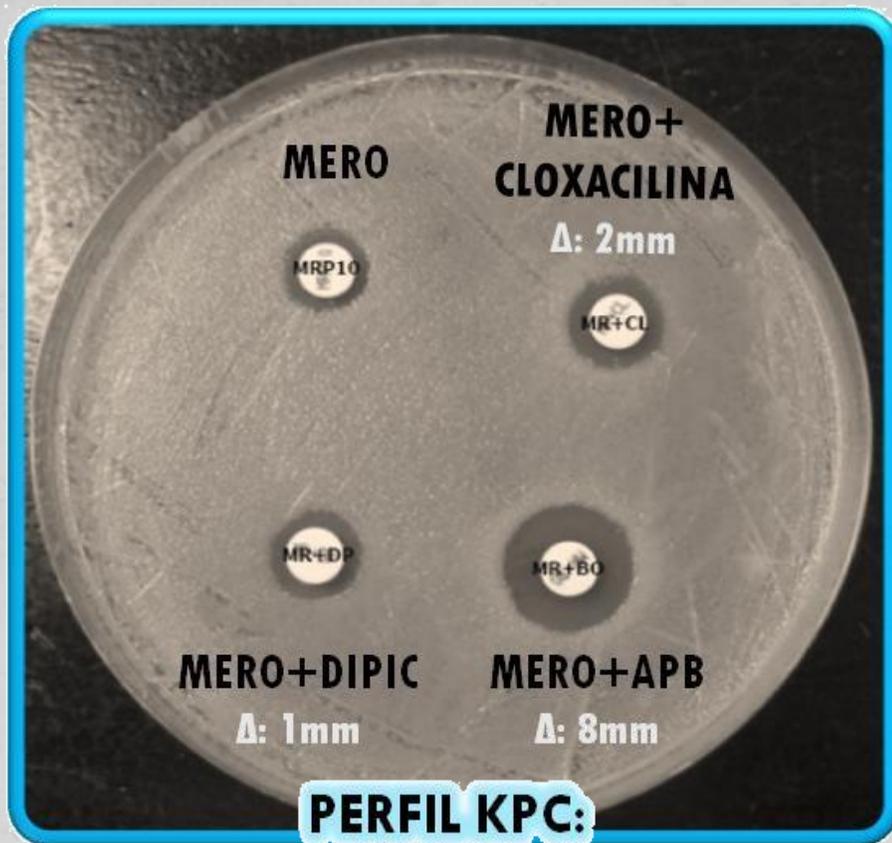
**DETECCION DE CARBAPENEMASAS:
Inhibición con Ac. Borónico y con EDTA**

***K. pneumoniae* KPC+**



***E. cloacae* MBL IMP-1**

DETECCION DE CARBAPENEMASAS: Método de discos combinados

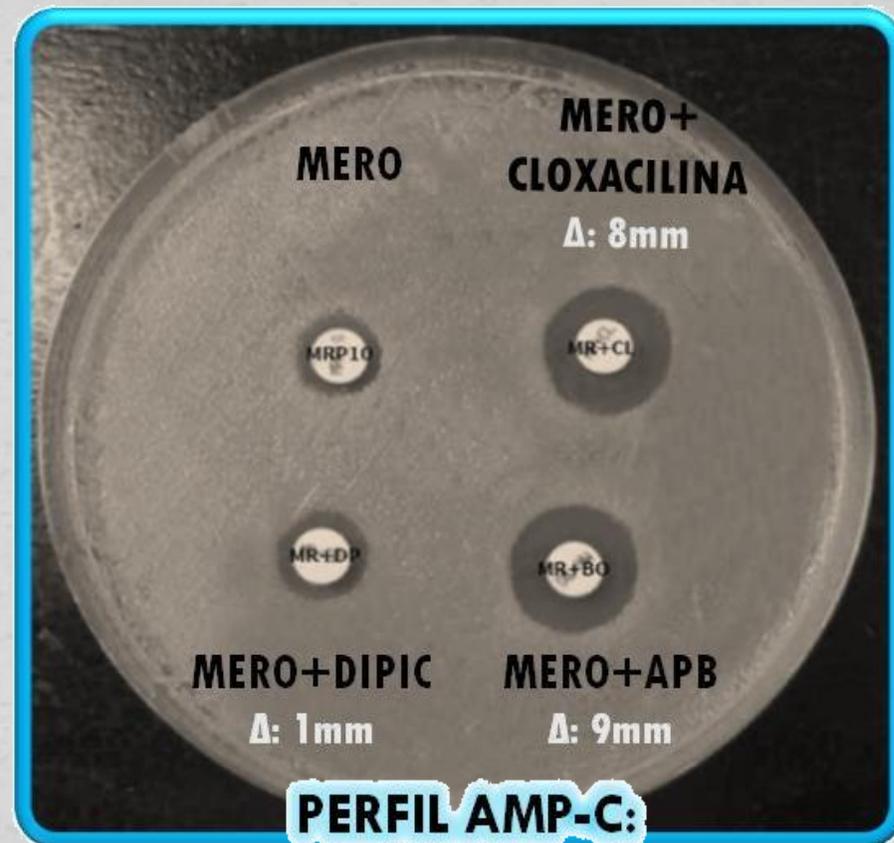


PERFIL KPC:

APB $\Delta \geq 4\text{mm}$ (POS)

CLOXACILINA $\Delta < 5\text{mm}$ (NEG)

DIPICOLINICO $\Delta < 5\text{mm}$ (NEG)



PERFIL AMP-C:

APB $\Delta \geq 4\text{mm}$ (POS)

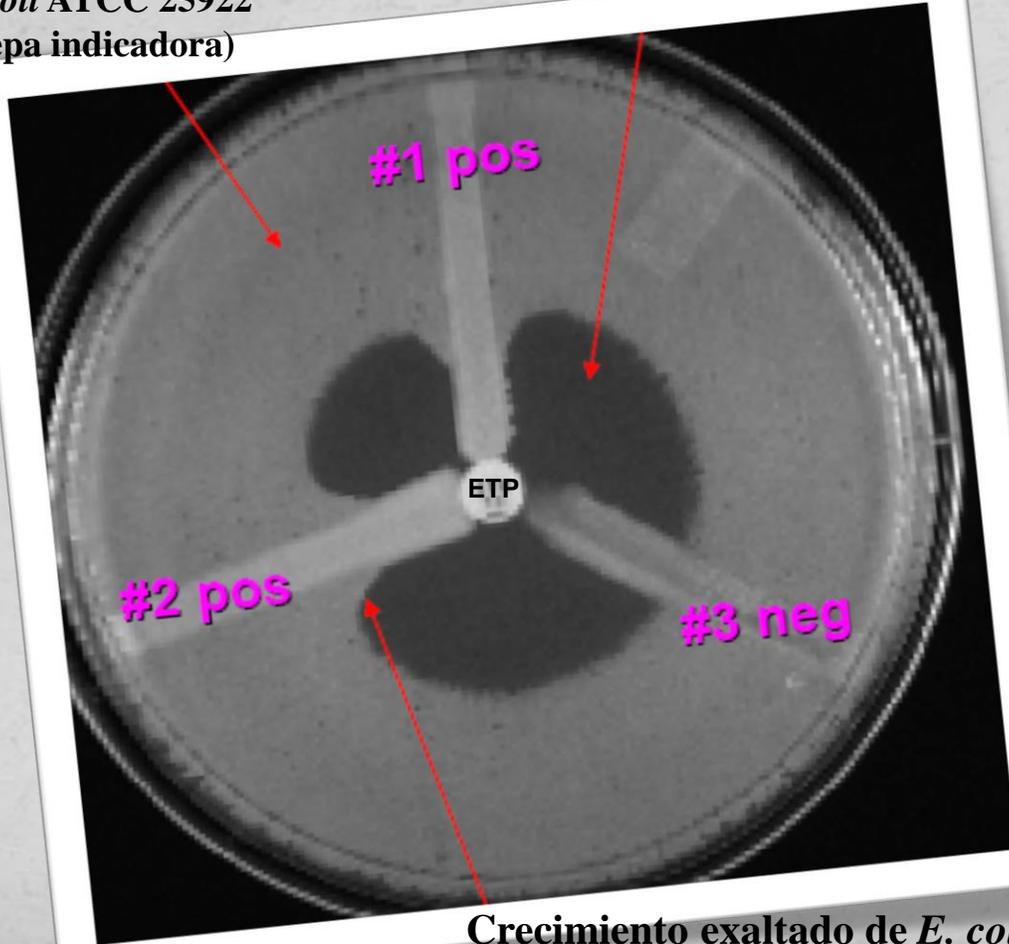
CLOXACILINA $\Delta \geq 5\text{mm}$ (POS)

DIPICOLINICO $\Delta < 5\text{mm}$ (NEG)

Método Microbiológico de Hodge: Detección de actividad enzimática

E. coli ATCC 25922
(cepa indicadora)

Zona de inhibición de ERT
en *E. coli* ATCC 25922



Crecimiento exaltado de *E. coli* ATCC 25922

Método Hodge

#1: Cepa clínica, resultado positivo

#2: *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1705,
control positivo

#3: *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1706,
control negativo

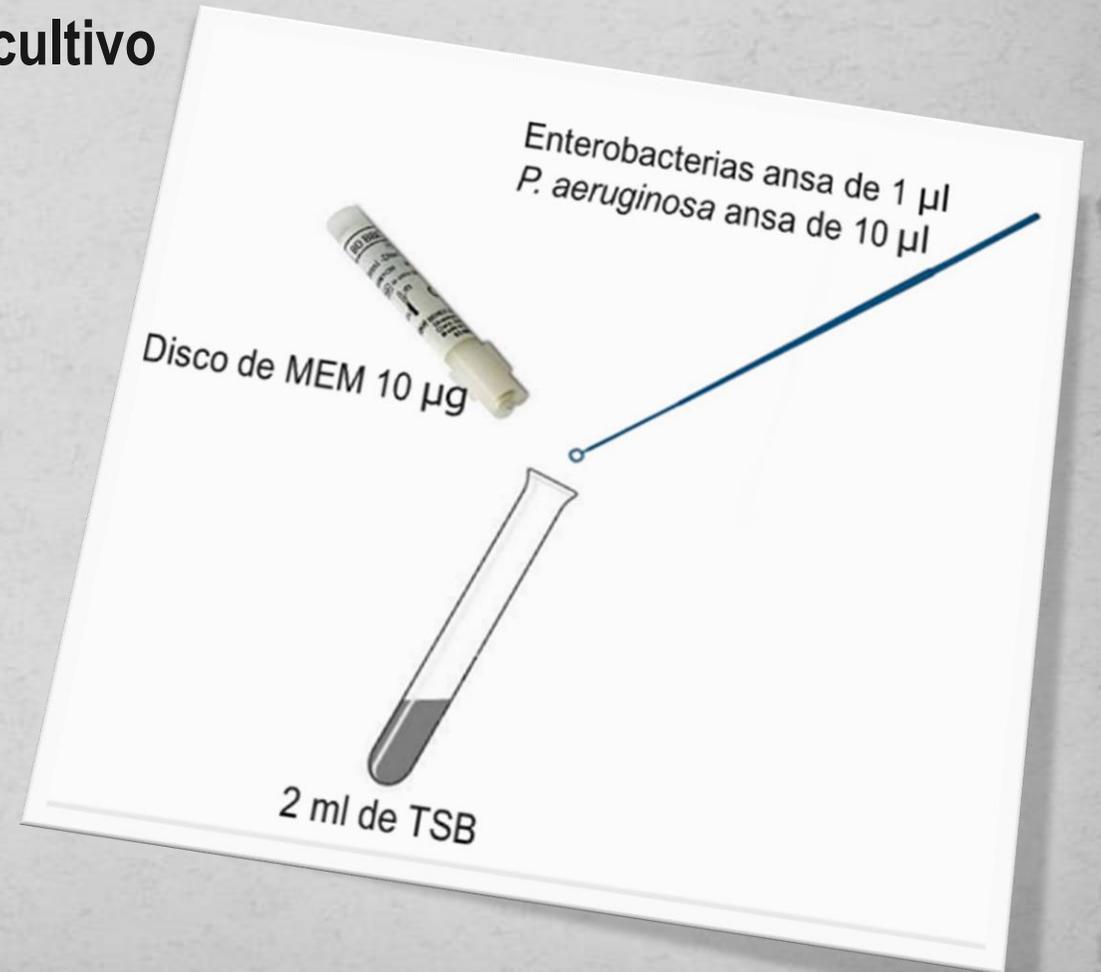
Método de Inactivación de Carbapenem modificado (mCIM)
para sospecha de producción de carbapenemasa

- mCIM: método para detección de carbapenemasa en Enterobacterales y *P. aeruginosa*
- eCIM: se realiza junto con el mCIM para diferenciar metalo- β -lactamasa de serin-carbapenemasa en Enterobacterales

mCIM: procedimiento

1. Inocular 2 ml de caldo TSB con la cepa a estudiar: ansa completa de 1 μ l para ETB y de 10 μ l para Pae (cultivo overnight en A. sangre)
2. Vortexear
3. Agregar un disco de 10 μ g de Meropenem
4. Incubar a 35°C por 4hs
5. Retirar el disco y colocarlo en una placa de MH hisopada con *E. coli* ATCC® 25922
6. Incubar a 35°C por 18-24hs
7. Leer el halo de inhibición e interpretar.

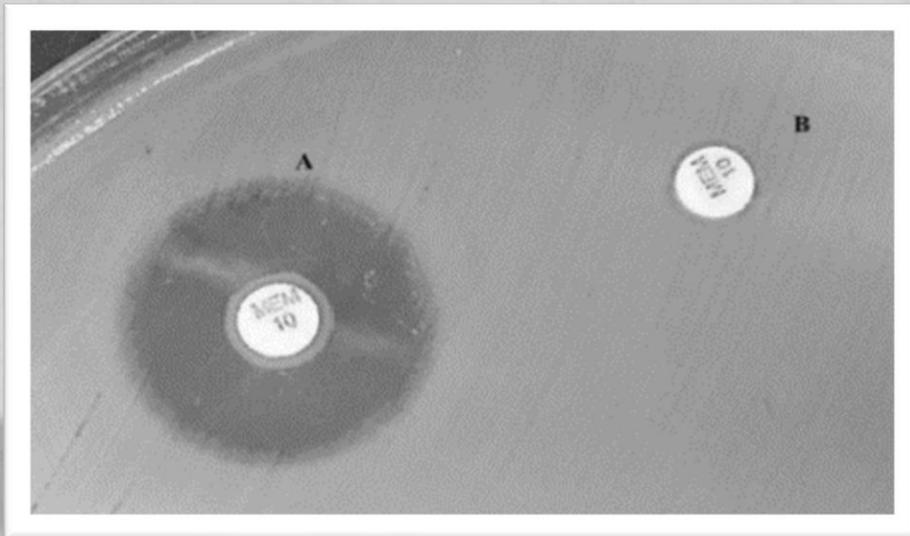
TABLA 3C, M100 32° ed.



mCIM: interpretación

TABLA 3C, M100 32° ed.

- Carbapenemasa positivo: halo entre 6-15 mm, o 16-18 mm con colonias intra-halo
- Carbapenemasa negativo: halo ≥ 19 mm
- Indeterminado: halo entre 16-18 mm, o ≥ 19 mm con colonias intra-halo

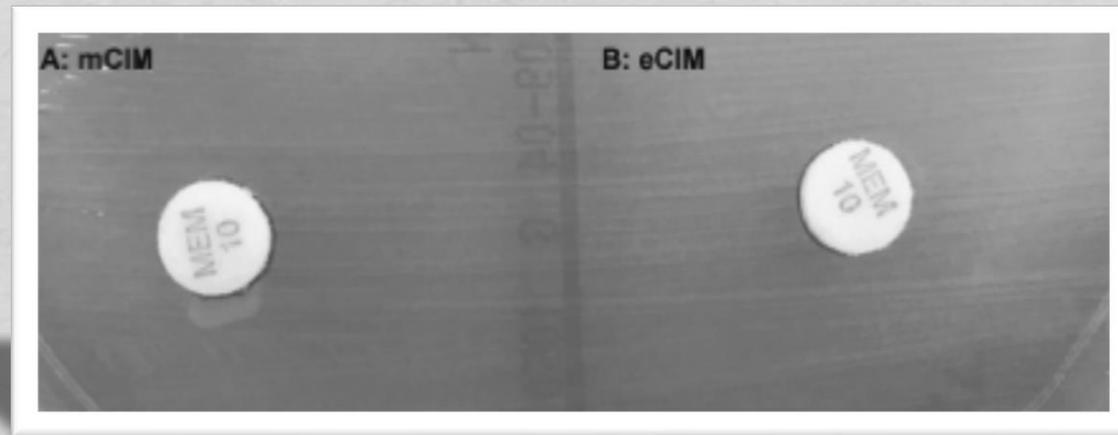


- A) Control Negativo: *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1706™
- B) Control Positivo: *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1705™

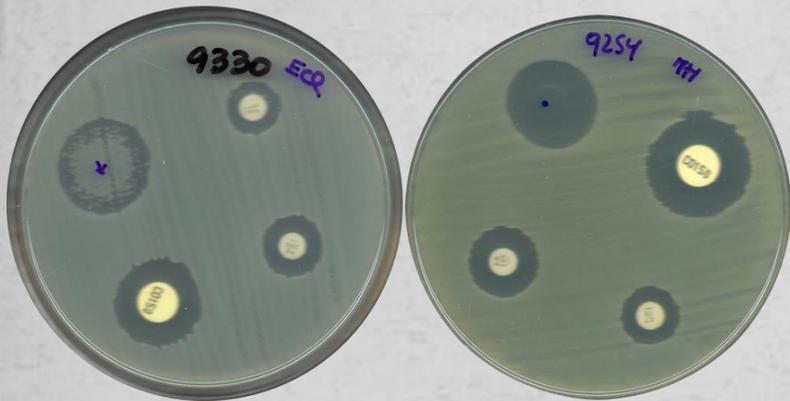
eCIM: interpretación

TABLA 3C, M100 32° ed.

- mCIM negativo → no interpretar eCIM
- mCIM positivo → MBL positivo: incremento de ≥ 5 mm del halo de eCIM vs. mCIM
→ Serín-carbapenemasa positivo: incremento de ≤ 4 mm del halo de eCIM vs. mCIM



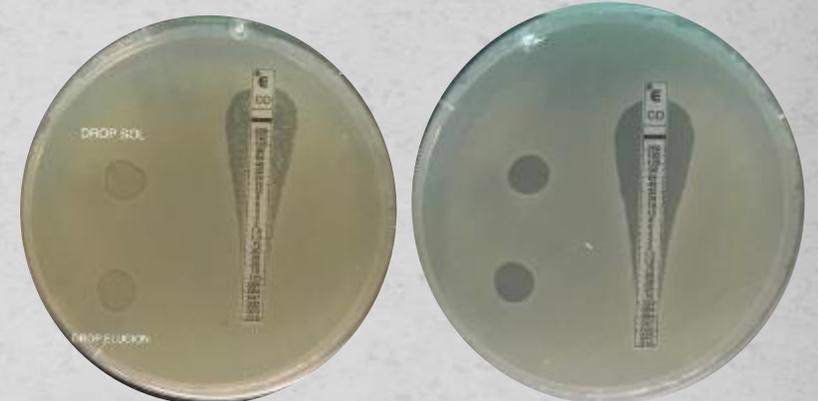
Métodos para la evaluación de sensibilidad a Colistín Enterobacterales, *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp.



Predifusión con tabletas



Colistín Agar Spot



Drop Test

GRACIAS POR SU ATENCION

ealboroz@anlis.gob.ar

atb@anlis.gob.ar

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS

