



SUSCEPTIBILIDAD A COLISTINA

Métodos:

Cribado a colistina por elución de disco

Elución de disco en caldo (CLSI)

Macrodilución de una sola concentración y agar colistina

Introducción:

En los últimos diez años, en esta era post antibiótica, la colistina ha resurgido como un último recurso frente a infecciones por patógenos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* del complejo *calcoaceticus-baumannii* y Enterobacteriales productoras de carbapenemasas. Esta molécula es un polipéptido cíclico perteneciente al grupo de las polimixinas, que por sus propiedades tensoactivas tiene la capacidad de alterar la permeabilidad de las bacterias gramnegativas susceptibles.

En función de ello, en el año 2016 se estableció un grupo de trabajo conjunto entre el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, Instituto de Estándares Clínicos de Laboratorio) y el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST; Comité Europeo de Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana) que abordó los retos globales asociados a la colistina, como la identificación de métodos de pruebas fiables, así como el establecimiento de puntos de corte de la concentración mínima inhibitoria.

De acuerdo con las recomendaciones emitidas por CLSI en el documento M100, para la susceptibilidad a colistina en *Acinetobacter baumannii* solo está recomendada la determinación de concentraciones mínimas inhibitorias por dilución en caldo, por lo que el método de macrodilución de una sola concentración puede ser un método alternativo.

Se debe tener en cuenta que los métodos de Kirby Bauer, epsilometría (gradiente de difusión) y equipos semiautomatizados, no están recomendados para la realización de las pruebas de susceptibilidad.

En el presente documento se describen las metodologías que se pueden emplear para la evaluación de pruebas de susceptibilidad a colistina.

MÉTODOS

Cribado de colistina

Material necesario

1. Cultivo joven puro (18-24 H), en agar sangre de carnero, agar soya tripticaseína o agar Mueller Hinton.
2. Sensidiscos de colistina de 10 µg
3. Caldo Mueller Hinton con cationes ajustados (MHCA) (ver anexo 1).
4. Tubos estériles (13 X100 mm).
5. Tubos con 2 mL de solución salina estéril
6. Pipeta automática para dispensar 17 µL
7. Incubadora 37°C.

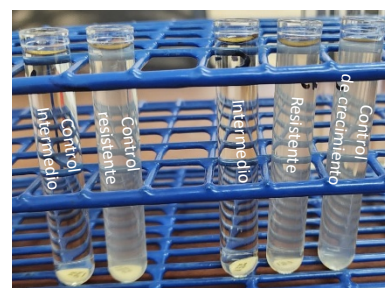
La presente técnica aplica para *Pseudomonas aeruginosa* y Enterobacterales (excepto los intrínsecamente resistentes, como los pertenecientes a la familia *Morganellaceae* y del género *Serratia*) [1].

Procedimiento

1. Etiquetar dos tubos estériles como:
 - A. Control crecimiento
 - B. Problema
2. Añadir 5 mL de caldo Mueller Hinton suplementado con cationes a cada uno.
3. Colocar un sensidisco de colistina, con técnica aséptica, en el tubo B.
4. Incubar por 30 min a 37°C o una hora a temperatura ambiente (Concentración final de colistina, 2 µg/mL).
5. Hacer una suspensión de la cepa a estudiar en 2 mL de solución salina y ajustar la turbidez al tubo 0.5 de McFarland (aproximadamente 1.5×10^8 UFC/mL).
6. En los primeros 15 minutos, posterior a la preparación del inóculo, agregar 17 µL de la suspensión bacteriana de la cepa problema a los tubos A y B (5.1×10^5 UFC/mL)[2].
7. Mezclar cada tubo suavemente e incubar a 37 2°C por 18-20 horas.
8. Observar el crecimiento al día siguiente y realizar la interpretación
9. Interpretación

Interpretación	Control de crecimiento (A)	Problema (B)	Control resistente	Control intermedio
Intermedio	Crecimiento	Inhibición		
Resistente	Crecimiento	Crecimiento		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 o <i>E. coli</i> BAA-3170*				Inhibición
Aislado clínico de <i>Proteus spp.</i> , o <i>Serratia marcescens</i>			Crecimiento	
Resultado inválido	Sin crecimiento		Sin crecimiento	Crecimiento

* < 1-4 µg/mL, con una moda de 2 µg/mL.





Observaciones

- En un resultado inválido, se debe procesar nuevamente el ensayo
- En resultados resistentes, se procesar nuevamente. En un segundo ensayo resistente, confirmar por microdilución en caldo o enviar a algún laboratorio de la red que realice determinaciones de microdiluciones en caldo.
- **No existe definición categórica de susceptible en las guías del CLSI, por lo que el resultado se emitirá como intermedio.**

Reporte

P. aeruginosa y Enterobacterales (exceptuando a los intrínsecamente resistente como los pertenecientes a la familia *Morganellaceae* y del género *Serratia*) [3].

- Intermedio: $\leq 2 \mu\text{g/mL}$
- Resistente: $> 2 \mu\text{g/mL}$

Control de calidad:

Realizar el mismo procedimiento usando la cepa control intermedio y la cepa control resistente (mismo procedimiento a partir del punto 5).

Cepas control

Control intermedio: *P. aeruginosa* ATCC 27853 *E. coli* BAA-3170 ($< 1-4 \mu\text{g/mL}$, con una moda de $2 \mu\text{g/mL}$).

Control resistente: cualquier aislamiento clínico de *Proteus spp.*, o *Serratia spp.*

Elución en disco CLSI

Material necesario

1. Cultivo joven puro (18-24 h), en agar sangre de carnero, agar soya tripticaseína o agar Mueller Hinton.
2. Sensidiscos de colistina de 10 µg
3. Caldo Mueller Hinton con cationes ajustados (MHCA) (ver anexo 1).
4. Tubos estériles (16x150 con tapón de rosca) con capacidad de 10 mL.
5. Tubos con 2 mL de solución salina estéril
6. Pipeta automática para dispensar 50 µL
7. Incubadora aerobiosis.

La presente técnica aplica para *Pseudomonas aeruginosa* y Enterobacterales (excepto los intrínsecamente resistente como los pertenecientes a la familia *Morganellaceae* y del género *Serratia*) [3].

Procedimiento

1. Etiquetar cuatro tubos estériles como:
 - A. Control crecimiento
 - B. 1 µg/mL
 - C. 2 µg/mL
 - D. 4 µg/mL
2. Añadir 10 mL de caldo Mueller Hinton suplementado con cationes a cada uno.
3. Colocar un sensidisco de colistina, con técnica aséptica, en los tubos tubo B, C y D.
4. Incubar por 30 min a 37°C o una hora a temperatura ambiente (Concentración final de colistina, 2 µg/mL).
5. Hacer una suspensión de la cepa a estudiar en 2 mL de solución salina y ajustar la turbidez al tubo 0.5 de McFarland (aproximadamente 1.5×10^8 UFC/mL).
6. Posterior a la preparación del inóculo, agregar 50 µL de la suspensión bacteriana de la cepa problema a los tubos A-D (7.5×10^5 UFC/mL).
7. Mezclar cada tubo suavemente e incubar a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18-20 horas.
8. Observar el crecimiento al día siguiente y realizar la interpretación
9. Interpretación

Interpretación	Control de crecimiento (A)	1 µg/mL	2 µg/mL	4 µg/mL	Control resistente	Control intermedio
Intermedio	Crecimiento	Inhibición	Inhibición	Inhibición		
Intermedio	Crecimiento	Crecimiento	Inhibición	Inhibición		
Resistente	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Inhibición		
Resistente	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 o <i>E. coli</i> BAA-3170*						Inhibición
Aislado clínico de <i>Proteus spp.</i> , o <i>Serratia marcescens</i>					Crecimiento	
Resultado inválido	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Crecimiento

* < 1-4 µg/mL, con una moda de 2 µg/mL



Observaciones

- En un resultado inválido, se debe procesar nuevamente el ensayo. Se considera un resultado incongruente cuando no existe patrón lógico de crecimiento, ejemplo, crecimiento en 4 µg/mL pero no en 2 o en 1 µg/mL.
- En resultados resistentes, se recomienda procesar nuevamente el ensayo. En un segundo ensayo resistente, confirmar por microdilución en caldo o enviar a algún laboratorio de la red que realice determinaciones de microdiluciones en caldo.
- **No existe definición categórica de susceptible en las guías del CLSI, por lo que el resultado se emitirá como intermedio.**

Reporte

P. aeruginosa y Enterobacterales (exceptuando a los intrínsecamente resistente como los pertenecientes a la familia *Morganellaceae* y del género *Serratia*) [3].

- Intermedio: ≤ 2 µg/mL
- Resistente: > 2 µg/mL

Control de calidad:

Realizar el mismo procedimiento usando la cepa control intermedio y la cepa control resistente (mismo procedimiento a partir del punto 5).

Cepas control

Control intermedio: *P. aeruginosa* ATCC 27853 *E. coli* BAA-3170 ($< 1-4$ µg/mL, con una moda de 2 µg/mL).

Control resistente: cualquier aislamiento clínico de *Proteus* spp., o *Serratia* spp.

Método de colistina en agar o agar colistina

Material necesario

1. Cultivo joven puro, en agar sangre de carnero, agar soya tripticaseína o agar Mueller Hinton.
2. Placas de 90-100 mm con agar Mueller Hinton con y sin colistina (sulfato de colistina) [2]. Placas con agar Mueller Hinton con concentraciones finales de 0 µg/mL (sin colistina. Se utilizará como control de crecimiento), 1 µg/mL, 2 µg/mL y 4 µg/mL.
3. Tubos con 2 mL de solución salina estéril.
4. Tubos estériles de 12x75 mm
5. Solución salina estéril.
6. Asa estéril de 10 µL
7. Incubadora aerobiosis.

La presente técnica aplica para *Pseudomonas aeruginosa* y Enterobacterales (excepto los intrínsecamente resistente como los pertenecientes a la familia *Morganellaceae* y del género *Serratia*) [3].

Procedimiento

1. Dividir cada placa con agar colistina en 10 partes.
 - A. 0 µg/mL (sin colistina, se usará como control de crecimiento)
 - B. 1 µg/mL
 - C. 2 µg/mL
 - D. 4 µg/mL
2. Hacer una suspensión de la cepa a estudiar en 2 mL de solución salina y ajustar la turbidez al tubo 0.5 de McFarland (aproximadamente 1.5×10^8 UFC/mL).
3. Realizar una dilución 1:10 del inóculo con la solución salina.
4. Con el asa de 10 µL, tomar de la dilución 1:10 e inocular sobre el agar colistina correspondiente a la identificación de la muestra para cada una de las placas (0, 1, 2 y 4 µg/mL)
5. Incubar a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18-20 horas.
6. Observar el crecimiento al día siguiente y realizar la interpretación
7. Interpretación

Interpretación	Control de crecimiento 0 µg/mL	1 µg/mL	2 µg/mL	4 µg/mL	Control resistente	Control intermedio
Intermedio	Crecimiento	Inhibición	Inhibición	Inhibición		
Intermedio	Crecimiento	Crecimiento	Inhibición	Inhibición		
Resistente	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Inhibición		
Resistente	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 o <i>E. coli</i> BAA-3170						Inhibición
Aislado clínico de <i>Proteus spp.</i> , o <i>Serratia marcescens</i>					Crecimiento	
Resultado inválido	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Crecimiento

* < 1-4 µg/mL, con una moda de 2 µg/mL.

Observaciones

- En un resultado inválido, se debe procesar nuevamente el ensayo. Se considera un resultado incongruente cuando no existe patrón lógico de crecimiento, ejemplo, crecimiento en 4 µg/mL pero no en 2 o en 1 µg/mL.
- En resultados resistentes, se recomienda procesar nuevamente el ensayo. En un segundo ensayo resistente, confirmar por microdilución en caldo o enviar a algún laboratorio de la red que realice determinaciones de microdiluciones en caldo.
- No existe definición categórica de susceptible en las guías del CLSI, por lo que el resultado se emitirá como intermedio.

Reporte

P. aeruginosa y Enterobacterales (exceptuando a los intrínsecamente resistente como los pertenecientes a la familia *Morganellaceae* y del género *Serratia*) [3].

- Intermedio: ≤ 2 µg/mL
- Resistente: > 2 µg/mL

Control de calidad:

Realizar el mismo procedimiento usando la cepa control intermedio y la cepa control resistente (mismo procedimiento a partir del punto 2).

Cepas control

Control intermedio: *P. aeruginosa* ATCC 27853 *E. coli* BAA-3170 (< 1-4 µg/mL, con una moda de 2 µg/mL)

Control resistente: cualquier aislamiento clínico de *Proteus spp.*, o *Serratia spp.*

Macrodilución de una sola concentración

Material necesario

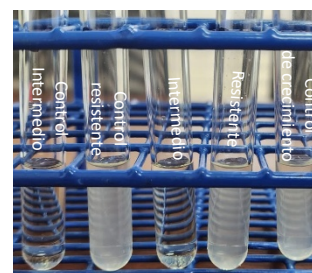
1. Cultivo joven puro, en agar sangre de carnero, agar soya tripticaseína o agar Mueller Hinton.
2. Caldo Mueller Hinton con cationes ajustados (MHCA) (ver anexo 1 en las páginas siguientes) con colistina a una concentración de 4 µg/mL.
3. Tubos estériles de 12x75 mm.
4. Solución salina estéril.
5. Tubos con 2 mL de solución salina estéril.
6. Pipeta automática para dispensar 6.6 µL
7. Incubadora aerobiosis.

Procedimiento

1. Etiquetar tubos estériles como:
 - A. Control crecimiento
 - B. Problema
2. Añadir 1 mL de solución salina estéril
3. Añadir 1 mL de caldo Mueller Hinton suplementado con cationes a cada uno (debido a que la concentración del caldo Mueller Hinton está a 4 µg/mL se estaría realizando una dilución 1:2, por lo que la concentración final es de 2 µg/mL) [1].
4. Eliminar 7 µL de la mezcla.
5. Hacer una suspensión de la cepa a estudiar en 2 mL de solución salina y ajustar la turbidez al tubo 0.5 de McFarland (aproximadamente 1.5×10^8 UFC/mL) [2].
6. Posterior a la preparación del inóculo, agregar 7 µL de la suspensión bacteriana de la cepa problema a los tubos A-B (5.2×10^5 UFC/mL) [2].
7. Mezclar cada tubo suavemente e incubar a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18-20 horas.
8. Observar el crecimiento al día siguiente y realizar la interpretación
9. Interpretación

Interpretación	Control de crecimiento (A)	2 µg/mL	Control resistente	Control intermedio
Intermedio	Crecimiento	Inhibición		
Resistente	Crecimiento	Crecimiento		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 o <i>E. coli</i> BAA-3170*				Inhibición
Aislado clínico de <i>Proteus spp.</i> , o <i>Serratia marcescens</i>			Crecimiento	
Resultado inválido	Sin crecimiento		Sin crecimiento	Crecimiento

* $< 1-4$ µg/mL, con una moda de 2 µg/mL.



Observaciones

- En un resultado inválido, se debe procesar nuevamente el ensayo.
- En resultados resistentes, se recomienda procesar nuevamente el ensayo. En un segundo ensayo resistente, confirmar por microdilución en caldo o enviar a algún laboratorio de la red que realice determinaciones de microdiluciones en caldo.
- **No existe definición categórica de susceptible en las guías del CLSI, por lo que el resultado se emitirá como intermedio.**

Reporte

P. aeruginosa y Enterobacterales (exceptuando a los intrínsecamente resistente como los pertenecientes a la familia *Morganellaceae* y del género *Serratia*). Esta metodología puede emplearse para *Acinetobacter baumannii* bajo el principio que es una macrodilución, sin embargo, el resultado debe considerarse bajo reserva hasta obtener más información.

Reporte

P. aeruginosa, *Acinetobacter* complejo *calcoaceticus-baumannii* y Enterobacterales (exceptuando a los intrínsecamente resistente como los pertenecientes a la familia *Morganellaceae* y del género *Serratia*) [3].

- Intermedio: $\leq 2 \mu\text{g/mL}$
- Resistente: $> 2 \mu\text{g/mL}$

Control de calidad:

Realizar el mismo procedimiento usando la cepa control intermedio y la cepa control resistente (mismo procedimiento a partir del punto 5).

Cepas control

Control intermedio: *P. aeruginosa* ATCC 27853 *E. coli* BAA-3170 ($< 1-4 \mu\text{g/mL}$, con una moda de $2 \mu\text{g/mL}$)

Control resistente: cualquier aislamiento clínico de *Proteus spp.*, o *Serratia spp.*

Anexo 1.

Soluciones madre de cationes

Paso	Acción	Comentario
1	Preparar solución madre de magnesio. Pesar 8.36 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ en 100 mL de agua desionizada.	Esta solución contiene 10 mg de Mg^{++} .
2	Preparar solución madre de magnesio. Pesar 3.68 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ en 100 mL de agua desionizada.	Esta solución contiene 10 mg de Ca^{++} .
3	Esterilizar por membrana de filtración.	
4	Almacenar las soluciones a $2-8^\circ \text{C}$	

Suplementación del caldo Mueller Hinton con cationes

Paso	Acción	Comentario
1	Preparar Mueller Hinton de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.	
2	Esterilizar el medio con autoclaveado	
3	Enfriar toda la noche de 2-8°C	Si el medio será utilizado el mismo día, puede ser enfriado de 2-8°C en baño con hielo.
4	Agitar el caldo y agregar 100 µL (0.1 mL) de las soluciones madre de Ca ⁺⁺ y Mg ⁺⁺ (frías) por cada litro de caldo. Esto permitirá tener una concentración final de 1 mg/L de cada uno de los cationes suplementados en el caldo Mueller Hinton	

Referencias

1. Luis Esaú L-J, Christian Rodolfo R-G, Melissa H-D, Claudia Adriana C-C, Rodolfo G-C, Rafael F-C. An alternative disk diffusion test in broth and macrodilution method for colistin susceptibility in Enterobacteriales. J Microbiol Methods. 2019;167: 105765. doi:10.1016/j.mimet.2019.105765
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. 12th ed. CLSI standard M07. USA: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI); 2024.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). M100. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 35th Ed. M100. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 35th Ed. 2025.

Realizó.

Dr. Luis Esaú López Jácome (Laboratorio de Microbiología Clínica INR-LGII)
M.C Melissa Hernández Durán (Laboratorio de Microbiología Clínica INR-LGII)