



# Determinación de la sensibilidad de los microorganismos frente a antimicrobianos de origen natural y la concentración mínima inhibitoria (CMI) por métodos fenotípicos

<b>Apellidos, nombre</b>	Pérez Esteve, Édgar (edpees@upv.es) Rivas Soler, Alejandro (alrso@tal.upv.es)
<b>Departamento</b>	Departamento de Tecnología de los Alimentos
<b>Centro</b>	Universitat Politècnica de València



## 1 Resumen de las ideas clave

Los consumidores cada vez más demandamos productos alimenticios con menos aditivos sintéticos, pero con mayor seguridad, calidad y vida útil. Estas demandas han llevado a un renovado interés en el uso de antimicrobianos naturales para conservar los alimentos. Entre los antimicrobianos de origen natural más estudiados están especias, hierbas y sus extractos; aceites esenciales de frutas o plantas; extractos de ajo o cebolla; así como enzimas, péptidos de origen vegetal, animal o marino. Sin embargo, todavía quedan muchas sustancias o extractos por evaluar. ¿Cómo determinar en este caso su actividad antimicrobiana? ¿Cómo saber si un antimicrobiano es más potente que otro? Para esto tenemos dos opciones: una cualitativa determinando halos de inhibición y otra cuantitativa determinando la concentración mínima inhibitoria, también conocida como CMI. Para ayudarte a enfrentarte a estas técnicas, en el presente artículo docente podrás revisar la importancia de determinar la sensibilidad de los microorganismos a un agente antimicrobiano, qué es la CMI y qué alternativas tienes para poder determinarla de manera experimental.

## 2 Objetivos

Una vez leído con detenimiento este documento, serás capaz de:

- Definir el término de “Concentración Mínima Inhibitoria”.
- Describir diferentes métodos para estudiar la sensibilidad de los microorganismos frente un antimicrobiano.
- Seleccionar el método que mejor se adapta a un determinado objetivo, o a la disponibilidad de material en el laboratorio.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria de un antimicrobiano frente a un determinado microorganismo.

## 3 Introducción

El estudio de la sensibilidad *in vitro* de las bacterias a los antimicrobianos se puede realizar mediante métodos fenotípicos (técnicas de dilución y de difusión), bioquímicos o genéticos. Debido a su simplicidad, los métodos fenotípicos son los primeros que se utilizan cuando se quiere evaluar la sensibilidad de los microorganismos frente a un nuevo compuesto antimicrobiano. Mientras las técnicas de difusión nos permiten hacer un *screening* inicial sobre la capacidad antimicrobiana de los compuestos a estudiar, las técnicas de dilución nos permiten determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), entendida como la concentración mínima de antimicrobiano que impide el crecimiento de un microorganismo en las condiciones del ensayo.

Las técnicas de difusión, se basan en la formación de un halo de inhibición por la generación de un gradiente de concentración de antimicrobiano en agar previamente inoculado, mientras que las técnicas de dilución se basan en la capacidad de crecimiento de un microorganismo en un medio (agar o caldo) que contiene una concentración conocida de antimicrobiano.

## 4 Desarrollo

### 4.1 Evaluación de la sensibilidad por el método de difusión

#### Fundamento

El método de difusión (basado en el **método Bauer-Kirby**), también llamado antibiograma disco-placa, es el método recomendado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos.

Este método consiste en depositar en la superficie de agar de una placa Petri, previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con diferentes concentraciones de antimicrobiano. En cuanto el disco impregnado se deposita en la superficie del agar, el filtro absorbe agua y el antimicrobiano difunde al agar. El antimicrobiano difunde radialmente a través del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Tras un tiempo de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición, también llamado **halo de inhibición**.

La aparición del halo de inhibición es consecuencia del doble proceso de difusión del antimicrobiano en el medio de cultivo desde el disco y de crecimiento del microorganismo. Además del tipo de antimicrobiano y del microorganismo, existen otros factores que influyen en el tamaño del halo: la concentración de antimicrobiano, la capacidad de difusión del antimicrobiano, la composición y profundidad de la capa del medio de cultivo, la concentración de agar, y la velocidad de crecimiento del microorganismo.

Los métodos disco-placa **no permiten una lectura directa del valor de la CMI**. Sin embargo, es una herramienta muy útil para realizar una primera evaluación de la capacidad antimicrobiana de un nuevo compuesto. Por ejemplo, imagina que quieres evaluar la capacidad antimicrobiana de un aceite esencial proveniente de una planta aromática. Para ello, en primer lugar, aplicaríamos esta técnica con diferentes microorganismos patógenos. Si el resultado es positivo, entonces ya podríamos determinar la CMI del extracto bruto mediante técnicas de dilución o analizar la composición del extracto y evaluar el efecto antimicrobiano de cada componente por separado.

Esta metodología es fácil de usar, rápida y de bajo coste económico. Sin embargo, con ella no se puede determinar directamente la CMI y no se puede usar en microorganismos de crecimiento lento o anaerobios.

#### Procedimiento

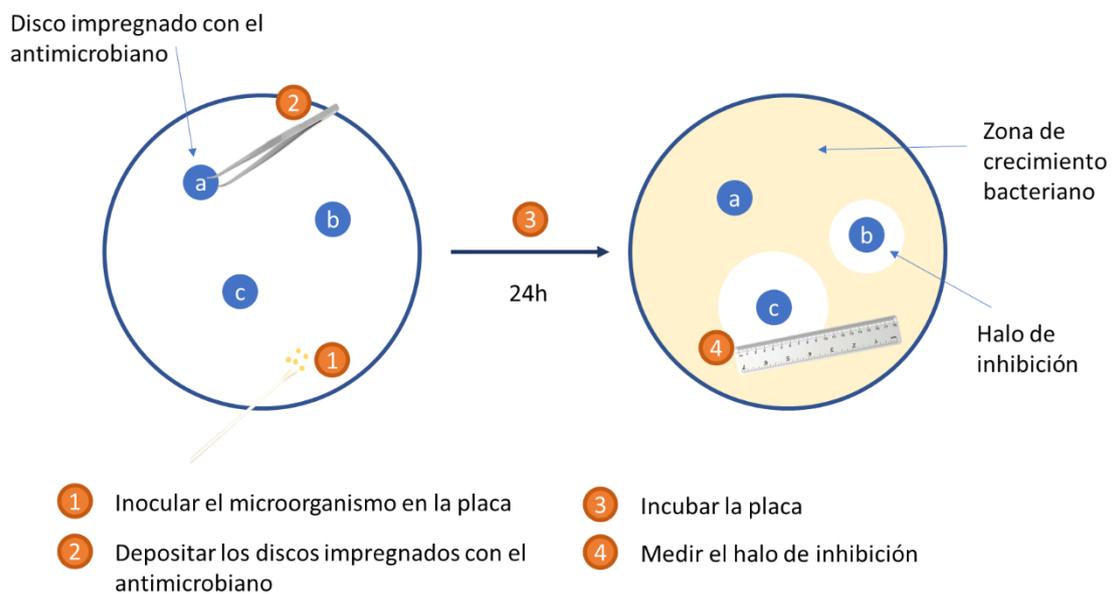
La determinación de los halos de inhibición (**Figura 1**) comienza con la inoculación de la superficie de la placa Petri de agar Mueller-Hinton con el microorganismo de referencia (concentración entre  $10^7$  y  $10^8$  ufc/mL) (**1**). Para ello se desliza el escobillón impregnado con el inóculo por la superficie del agar tres veces, rotando la placa unos  $60^\circ$  cada vez y pasándola por último por el borde de la placa para conseguir una siembra uniforme. Una vez inoculado se dejan secar de 3 a 5 minutos.

Una vez secas las placas, el siguiente paso sería depositar los discos impregnados con el antimicrobiano (**2**), pudiéndose realizar automáticamente con dispensadores o mediante pinzas estériles. Hay que asegurarse que los discos contacten perfectamente con la superficie, para ello

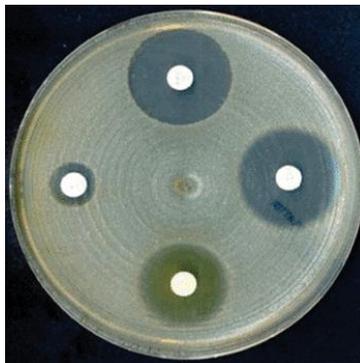
se presionan ligeramente sobre la superficie del agar. Si se trabajan con varios discos por placa (por ejemplo, con un mismo antimicrobiano pero a diferentes concentraciones), hay que distribuirlos de tal forma que no se produzcan superposición de los halos de inhibición.

Tras depositar los discos en la placa, éstas se incuban (3) en posición invertida durante el tiempo y la temperatura adecuada para el crecimiento del microorganismo.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se mediría el halo de inhibición con una regla (4). La presencia y el tamaño del halo nos proporciona información sobre la capacidad antimicrobiana del compuesto estudiado, en las concentraciones y condiciones ensayadas. La **Figura 2** muestra una fotografía real de una placa en la cual se han ensayado diferentes antimicrobianos.



**Figura 1.** Esquema del proceso de determinación de la susceptibilidad a un agente antimicrobiano por el método de difusión



**Figura 2.** Antibiograma de disco de difusión



### Caso práctico

Se quiere comparar la actividad antimicrobiana de un aceite esencial (AE) y de un antibiótico (AB) frente a *E. coli*, *L. monocytogenes* y *S. typhimurium*. Para ello se han obtenido los halos de inhibición que se muestran en la **Tabla 1**. ¿Ambos antimicrobianos son de igual efectividad frente al *E. coli*?

**Tabla 1.** Halos de inhibición (mm) de varios patógenos frente a la misma concentración de un aceite esencial y un antibiótico.

Antimicrobiano	Microorganismo patógeno		
	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. typhimurium</i>
Aceite Esencial	15 ± 1	23 ± 2	17 ± 3
Antibiótico	15 ± 1	35 ± 4	22 ± 3

Como se ha comentado en el apartado de fundamento de la técnica no podríamos concluir si son igualmente efectivos, ya que hay que tener en cuenta la capacidad de difusión de los antimicrobianos en el agar. Lo que sí podríamos concluir es que ambos son más efectivos frente a *L. monocytogenes*, que frente a las otras dos especies.

## 4.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria mediante métodos de dilución

La cuantificación de la actividad *in vitro* de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante métodos de dilución. Estos métodos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en un medio de cultivo (caldo o agar).

A pesar de ser métodos más complejos y caros si los comparamos con los métodos de difusión, la ventaja de los métodos de dilución radica en una mayor sensibilidad cuando se trabaja con bajas concentraciones de antimicrobiano y, además, permite determinar si hay **efecto bactericida** (muerte del microorganismo) o **efecto bacteriostático** (inhibición de crecimiento). Por otra parte, la gran cantidad de variables (microorganismo, medio de cultivo, inóculo) que influyen en estos métodos son responsables de una variabilidad en el resultado obtenido, por lo que para su correcta evaluación es necesario que se realicen de forma estandarizada.

### 4.2.1 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria mediante el método de dilución en agar

#### Fundamento

En este método se incorpora el antimicrobiano a evaluar a un medio con agar, se inocula con el microorganismo y se observa si hay crecimiento.

Como el antimicrobiano se incorpora al agar, este método permite estudiar el efecto del mismo en varios microorganismos en una misma placa. A su vez presenta la desventaja de requerir cantidades importantes de antimicrobiano en la incorporación al agar.

### Procedimiento

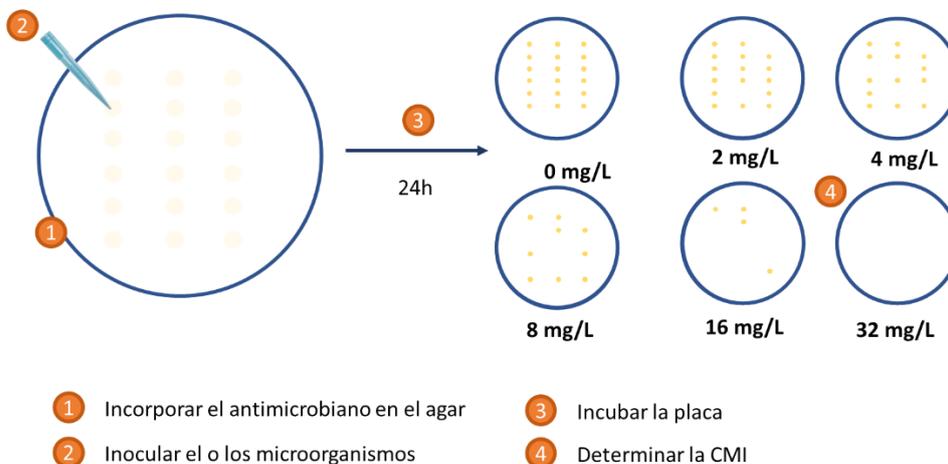
El procedimiento (**Figura 3**) consta de tres etapas: preparación del antimicrobiano, preparación e incorporación del inóculo y lectura del resultado.

En primer lugar, se incorporará el antimicrobiano en el agar (**1**). En la mayoría de los casos, el medio de cultivo a emplear es agar Mueller-Hinton, pero en función de los microorganismos y de sus necesidades nutritivas puede ser adecuado o necesario añadir algún suplemento a este medio, o incluso, emplear un medio diferente. Para ello, se esteriliza el agar y se deja enfriar a 50°C, momento en cual se adicionan los suplementos (si fuera necesario) y la solución del antimicrobiano. Hay que tener en cuenta la dilución en el agar para el cálculo final de la concentración de antimicrobiano. El pH del medio debe estar comprendido entre 7.2 y 7.4. Tras la incorporación del antimicrobiano, se mezcla bien y se vierte en las placas Petri (3-4 mm de espesor) evitando en todo momento la formación de burbujas. Posteriormente se dejan solidificar las placas, que se usarán inmediatamente o se almacenarán en frigorífico en bolsas de plástico.

Una vez preparadas las placas, se procede a preparar el inóculo. La concentración del mismo debe ser aproximadamente de  $10^5$  ufc/mL. Existen diferentes métodos para determinar la concentración del inóculo: usando la escala de McFarlan, por lectura de absorbancia (previa realización de la recta de calibrado), mediante cámara de Thoma, etc.

A continuación, se deposita una gota del inóculo (aproximadamente  $10^4$  ufc/mL) y se mantienen a temperatura ambiente hasta que las gotas se hayan secado (**2**). En una misma placa se puede depositar gotas con inóculos de diferentes microorganismos. Paralelamente, se inocula una placa control sin antimicrobiano. Posteriormente se incuban durante un tiempo y a una temperatura adecuada para el microorganismo (**3**).

Finalmente se determina la CMI (**4**), siendo la menor concentración de antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento bacteriano. Para ello no se considera crecimiento la aparición de una colonia aislada o de un halo tenue debido al propio inóculo).



**Figura 3.** Esquema del proceso de determinación de la CMI mediante el método de dilución en agar



### Caso práctico

A partir del ejemplo de la **Figura 3**, ¿cuál sería la concentración mínima inhibitoria del posible antimicrobiano testado? Como puedes observar, la primera placa en la que no hay crecimiento microbiano es la placa donde se había incorporado 32 mg/L. Por tanto, para todas las posibles cepas ensayadas, esta sería la CMI.

## 4.2.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria mediante el método de dilución en caldo

### Fundamento

El método de dilución en caldo se basa en la presencia o ausencia de crecimiento de un microorganismo en un caldo en presencia de una concentración de antimicrobiano. Para ello se comprueba visualmente si los tubos o pocillos presentan turbidez. Este método se divide en macrodilución (si se usan tubos de ensayo) o microdilución (si se usan placas multipocillo). Se recomienda para la mayoría de los microorganismos utilizar caldo Mueller-Hinton, al que se añadirán los suplementos necesarios. El medio debe tener un pH de 7.2 a 7.4 y estar ajustado con  $\text{Ca}^{2+}$  (20-25 mg/l) y  $\text{Mg}^{2+}$  (10-12.5 mg/l).

Los métodos de microdilución en caldo son una técnica útil para determinar MIC, en un gran número de muestras, sin embargo, requiere de una instrumentación específica. En el caso del método de macrodilución, aunque es más laborioso, se utiliza material de laboratorio de uso común.

### 4.2.2.1 Macrodilución en caldo

#### Procedimiento

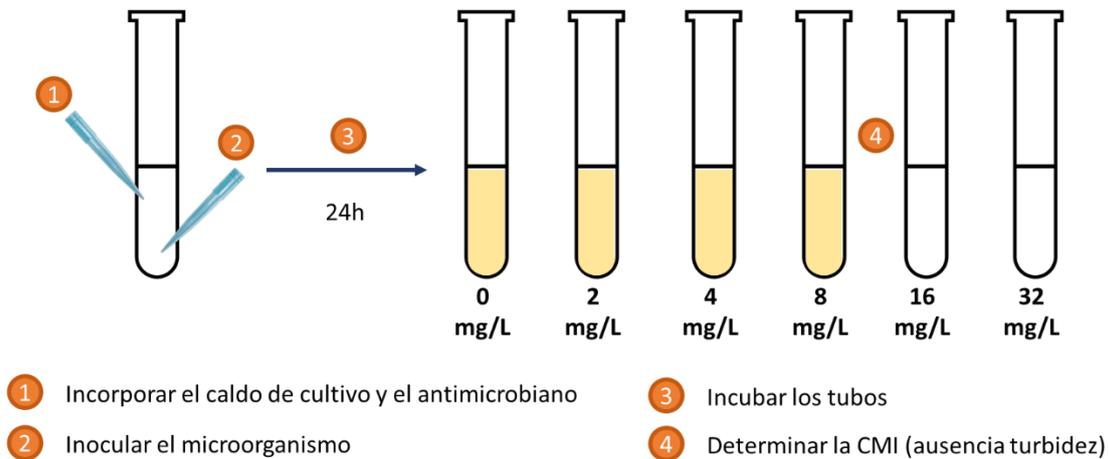
En el método de macrodilución se emplea por cada combinación microorganismo/antimicrobiano una batería de tubos.

En primer lugar, se preparan tubos que contengan 1 mL de caldo estéril (**1**). Hay dos formas de preparar los tubos con cantidades decrecientes de antimicrobiano. Un método es adicionar una cantidad de solución antimicrobiana diferente a cada tubo mientras que el otro método es preparar el tubo de mayor concentración de antimicrobiano y, a partir de éste, realizar diluciones seriadas. La serie de tubos se completa con uno de control sin antimicrobiano que solamente tiene 1 mL de caldo.

A continuación, a cada tubo se le adiciona 1 mL de inóculo (**2**), de tal forma que la concentración final esté comprendida entre 1 y  $5 \times 10^5$  ufc/mL.

Una vez inoculados se incuban los tubos durante un tiempo y a una temperatura adecuada para el microorganismo (**3**).

Tras la incubación se observarán unos tubos sin turbidez (**4**) y otros, posiblemente, con diferente grado de turbidez. La CMI es la menor concentración de antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento bacteriano, es decir, sin turbidez. El tubo control sin antimicrobiano debería estar turbio.



**Figura 4.** Esquema del proceso de determinación de la CMI mediante el método de macrodilución en caldo.

### Caso práctico

A partir del ejemplo de la **Figura 4**, ¿cuál sería la concentración mínima inhibitoria del posible antimicrobiano testado? Como puedes observar, el primer tubo en la que no hay crecimiento microbiano (ausencia de turbidez) es el tubo donde se había incorporado 16 mg/L. Por tanto, para todas las posibles cepas ensayadas, esta sería la CMI.

#### 4.2.2.1 Microdilución en caldo

##### Procedimiento

El procedimiento del método por microdilución es similar al método por macrodilución. En éste método (**Figura 5**), cada una de los pocillos de la placa de microtitulación representa uno de los tubos del método de macrodilución.

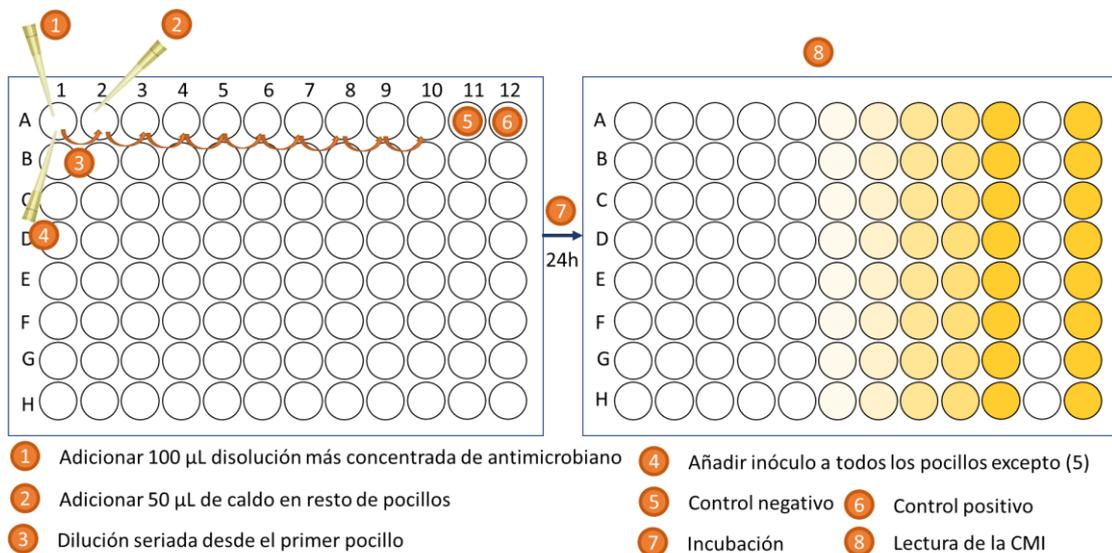
En primer lugar, se adiciona 100  $\mu\text{L}$  de solución de antimicrobiano con la concentración más elevada al primer pocillo (1). La solución madre de antimicrobiano se debe preparar en caldo Mueller-Hilton. En el cálculo de la concentración de antimicrobiano, hay que tener en cuenta la dilución de la muestra cuando se adiciona el inóculo. Al resto de los pocillos de la fila se adiciona 50  $\mu\text{L}$  de caldo Mueller-Hilton estéril (2).

Partiendo del primer pocillo, se realiza una dilución seriada, tomando 50  $\mu\text{L}$  del primer pocillo (concentración más alta) y adicionándolo al siguiente pocillo, y así sucesivamente (3).

A continuación, a cada pocillo se le adiciona 50  $\mu\text{L}$  de inóculo (4). La concentración final en cada pocillo debe estar comprendido ente 1 y  $5 \times 10^4$  ufc/mL. Los dos últimos pocillos se reservan para el control positivo (sin antimicrobiano) (5) y el control negativo (sin inóculo) (6).

Una vez inoculadas, las placas de microdilución deben taparse o sellarse con adhesivo para evitar la evaporación del medio de cultivo cuando se incuben. Los tubos o placas se incubarán en las condiciones necesarias para que crezca el microorganismo (7).

Tras la incubación se procede a la lectura de los resultados (8). La CMI se define como la menor concentración de antimicrobiano que a simple vista inhibe completamente el crecimiento del microorganismo estudiado. La interpretación de los resultados, que a veces resulta compleja, se facilita tomando como referencia el crecimiento observado en pocillos usados como control positivo.



**Figura 5.** Esquema del proceso de determinación de la CMI mediante el método de microdilución en caldo.

### Caso práctico

A partir del ejemplo de la **Figura 5**, ¿cuál sería la concentración mínima inhibitoria del antimicrobiano testado si en el primer pocillo se ha adicionado 100 µL de una concentración tal para que la concentración final en el pocillo sea de 200 mg/L? Como puedes observar, el último pocillo en la que no hay crecimiento microbiano (ausencia de turbidez) es el pocillo número 5. Por tanto, la concentración de antimicrobiano adicionada en esa columna sería la CMI. ¿Y qué concentración es esa? Pues muy fácil. Si hemos adicionado 200 mg/L en el primer pocillo y hacemos diluciones seriadas en las que cada vez llevamos la concentración a la mitad, en el segundo pocillo habrá 100 mg/L, en el tercero 50 mg/L, en el cuarto 25 mg/L y en el quinto 12.5 mg/L. Por tanto, en este caso la CMI sería 12.5 mg/L.



## 5 Cierre

A lo largo de este objeto de aprendizaje hemos revisado el concepto de concentración mínima inhibitoria y los tipos de procedimientos que podemos realizar en el laboratorio para determinarla. Además, a través de casos prácticos hemos conocido el procedimiento de cálculo de la CMI para cada uno de los métodos. Conocer todas estas posibilidades te permitirá seleccionar la más adecuada a tu propósito (explorar muchos tipos de antimicrobianos o sobre muchas cepas distintas, determinar el valor de CMI de un determinado antimicrobiano sobre una determinada cepa...) o al material disponible en el laboratorio.

## 6 Bibliografía

Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966; 45: 493-496.

Collins, C.H, Lyne, P.M., Grange, J.M., Falkinham, J.O. *Microbiological Methods*. Arnold Ed. London. 2004.

EUCAST. Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method. Version 9.0. 2021.

Grupo MENSURA. Recomendaciones del grupo MENSURA para la selección de antimicrobianos en el estudio de la sensibilidad y criterios para la interpretación del antibiograma. *Rev Esp Quimioterap* 2000; 13: 73-86.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M7-A5. 2000. NCCLS, Wayne, Pa.

SEIMC. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Editor: Picazo, J.J. 2000