

Método de Screening "COLISTIN AGAR-SPOT"



Desarrollado en el Servicio Antimicrobianos, INEI ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"

Versión 2 – Agosto 2017

Consideraciones generales:

- El presente es un método de screening para la evaluación de la sensibilidad a colistín en aislamientos de Enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp.

La prueba se realiza en placa preparada de forma manual conteniendo agar Mueller-Hinton (MH) y una concentración de 3µg/ml colistín-sulfato en la cual se siembra un spot del aislamiento a investigar.

- La droga apta para este ensayo es el **COLISTIN SULFATO**.

Ej: Colistín sulfato sal ≥ 15.000 UI/mg, Sigma-Aldrich® (Catalogo: C4461)

De ninguna manera en este método se puede utilizar el frasco ampolla (formulación farmacéutica) que contiene Colistín metanosulfonato (de uso In Vivo).

Preparación de solución de stock de colistín:

Preparar una solución stock de **60 µg/ml** de colistín sulfato.

Para colistín sulfato, la potencia se expresa en UI/mg. Recordar que 1UI equivale a 0.0332 µg. Expresar la potencia en µg/mg para poder incluir en la fórmula:

Volumen de Sol (ml) = $\frac{\text{Pesada de ATB (mg)} \times \text{Potencia de ATB (µg/mg)}}{\text{Concentración de Sol (µg/ml)}}$

Concentración de Sol (µg/ml)

Aplicar la fórmula para conocer el volumen exacto de agua a agregar para obtener la solución stock deseada.

- Preparación de placas del COLISTIN AGAR-SPOT:

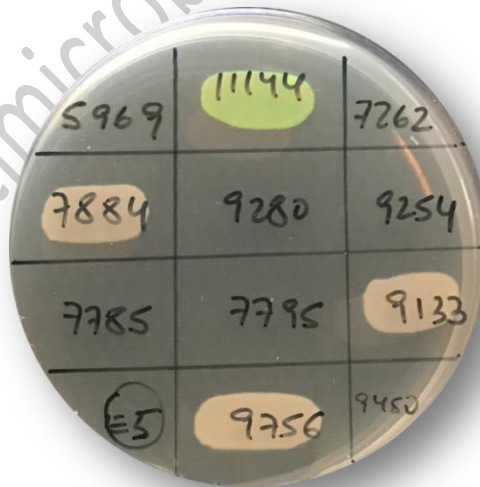
Verter 1ml de solución stock de 60µg/ml de colistín sulfato y 19ml de agar MH estéril a una temperatura aprox de 50°C (dilución 1/20) en una placa de petri de 90x15mm. Para evitar el pegado de colistín al plástico es conveniente verter primero los 19 ml de agar MH e inmediatamente después agregar 1 ml de la solución stock de colistín sulfato. Mezclar

suavemente para homogeneizar. **La concentración final en la placa será de 3µg/ml.** Dejar enfriar y conservar en heladera hasta su uso. Estabilidad en heladera: hasta 5 meses.

Procedimiento:

1. Retirar la placa de 3µg/ml de colistín de heladera y constatar de que no haya humedad en la superficie antes de inocular. Secar si fuese necesario.
2. Preparar una suspensión equivalente al 0,5 de Mc Farland en Sol. Fisiológica del aislamiento a ensayar.
3. Tomar un hisopo estéril y embeberlo en la suspensión 0,5 de Mc Farland del aislamiento a ensayar, descargar el exceso de líquido presionando firmemente el hisopo en las paredes del tubo por encima del nivel del líquido y proceder a inocular la placa realizando un spot de aprox. 10-15 mm de diámetro sobre la superficie de la placa. En una placa se pueden ensayar hasta 12 aislamientos. Ver Esquema.
4. Incubar la placa a 35-37°C durante 18-20hs.
5. Interpretación:
 - **Crecimiento positivo: visualización de >1 colonia → Resistencia a colistín.**
 - **Crecimiento negativo: sin desarrollo bacteriano o 1 colonia → Sensibilidad a colistín.**
6. Incluir en cada lote de placas preparadas, una cepa de control positivo: *E. coli* M19736, resistente a colistín (*mcr-1+*), o cualquier aislamiento que previamente haya dado CIM a COL ≥4µg/ml por el método de referencia (microdilución en caldo, BMD) y dos controles negativos (*E.coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853).

Esquema del ensayo **COLISTIN AGAR-SPOT:**



Aislamientos 11144, 7884, 9133 y 9756: **desarrollo positivo → Resistente a colistín.**

Aislamientos 5969, 7262, 9280, 9254, 7785, 7795, E5, 9450: **sin desarrollo → Sensible a colistín.**

- COLTEST® (BRITANIA) (en proceso de evaluación en ANMAT)

Placa de agar comercial para evaluación de la sensibilidad a colistín en agar spot. Tanto el procedimiento como la interpretación se realizan de igual manera al protocolo de **COLISTIN AGAR-SPOT** arriba especificado.

- Evaluación de COLISTIN AGAR-SPOT y COLTEST® en el Laboratorio Nacional de Referencia:

Para evaluar esta metodología, se compararon los resultados del **COLISTIN AGAR-SPOT** y **COLTEST®** con los obtenidos por microdilución en caldo para colistín (BMD- método de referencia) en conjunto a la detección del gen *mcr-1* por PCR (resistencia plasmídica transferible a colistín).

En esta evaluación se incluyeron 260 aislamientos clínicos: 200 Enterobacterias, 30 *P. aeruginosa* y 30 *Acinetobacter* spp.

Resultados:

Grupo Bacteriano	Método de referencia	COLISTIN AGAR-SPOT (colistín: 3 µg/ml)			COLTEST Britania		
		% CA	% VME (falsa S)	% ME (falsa R)	% CA	% VME (falsa S)	% ME (falsa R)
<i>Acinetobacter</i> spp.	BMD (CLSI)	100	0	0	100	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BMD (CLSI)	100	0	0	100	0	0
Enterobacterias	BMD (CLSI) y PCR <i>mcr-1</i>	99.5	0.9	0	100	0	0

CA: Concordancia en la categoría; VME: Error muy mayor; ME: Error mayor.