

**Protocolo para determinación de Concentración Inhibitoria Mínima por el Método de Microdilución. Aplicación para determinar la sensibilidad a Colistín.**

**Adaptado de CLSI M7-A10**

**Versión 1 – Julio 2017**

Consideraciones generales:

- La prueba se realiza en policubetas de plástico estériles de fondo redondo.
- El medio de elección para la determinación por método de dilución es el caldo Mueller Hinton ajustado en cationes (CAMHB). Ver Anexo.
- En el caso de Colistín, la droga apta para este ensayo es el **COLISTIN SULFATO**.

**De ninguna manera se puede utilizar el frasco ampolla que contiene Colistín Metano-sulfonato.**

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

- Las concentraciones a ensayar deben determinarse de acuerdo a los puntos de corte CLSI/EUCAST vigentes, y se recomienda elegir el rango de concentraciones de manera tal que también incluya el rango de CIM de al menos una cepa patrón de control de calidad.

Para el caso de Colistín, los puntos de corte recomendados son los propuestos por EUCAST: Sensible  $\leq 2\mu\text{g/ml}$ ; Resistente  $\geq 4\mu\text{g/ml}$ .

Las cepas ATCC recomendadas y sus rangos de aceptabilidad (CLSI M100-2017) son: *E. coli* ATCC 25922: 0.25-2 $\mu\text{g/ml}$ ; *P. aeruginosa* ATCC 27853: 0.5-4 $\mu\text{g/ml}$ .

Preparación de la solución de antibiótico:

Para determinar la cantidad de polvo antimicrobiano (ATB) o solvente necesarios para preparar una solución estándar (SE) se puede utilizar la siguiente fórmula:

$$\text{Fórmula:} \quad \text{Volumen de SE (ml)} = \frac{\text{Pesada de ATB (mg)} \times \text{Potencia de ATB } (\mu\text{g/mg})}{\text{Concentración de SE } (\mu\text{g/ml})}$$

La pesada del antibiótico a ensayar se debe hacer en balanza analítica calibrada, con una precisión igual o superior al décimo de miligramo, y se debe evitar pesar cantidades muy pequeñas de droga ya que estas acarrear alto error (si es posible se recomienda pesadas superiores a los 10 mg). Aplicar la fórmula para conocer el volumen exacto de agua a agregar para obtener la concentración deseada.

**En el caso de colistín, la potencia viene expresada en UI/mg. Recordar que 1UI equivale a 0.0332 µg.** Expresar la potencia en µg/mg para poder incluir en la formula.

#### Preparación y almacenamiento de la solución de colistín:

La solución de antibiótico se debe preparar de una concentración tal, que duplique la deseada. Es decir, si en el pocillo más concentrado deseo una concentración final de 32µg/ml, entonces la concentración de antibiótico dispensada en el pocillo deberá ser 64µg/ml, de manera que al agregar el inóculo bacteriano, la concentración final sea la deseada.

Para preparar las placas de microdilución, se deben realizar diluciones seriadas al medio en CAMHB en tubos de vidrio, teniendo en cuenta que deberá dispensar en cada pocillo 25µl del antibiótico. Cada policubeta debe incluir un pocillo de control de crecimiento (sin antibiótico) y un control negativo (caldo sin inocular).

Las policubetas, con las diluciones cargadas, si no van a ser utilizadas inmediatamente, pueden sellarse después de preparadas en una bolsa de plástico y guardarse a  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  (si es posible a una temperatura igual o menor que  $-60^{\circ}\text{C}$ ) hasta el momento de su utilización. La mayoría de los antibióticos conservados de esta manera se mantienen estables por varios meses. Las policubetas con las soluciones de antibiótico no deben ser guardadas en freezer autodescongelables y una vez descongeladas, no debe volver a congelarse.

#### Preparación del inóculo e inoculación:

Ajustar el inóculo a una turbidez comparable al 0,5 de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/ml). Realizar una dilución 1/100 del 0,5 de Mc Farland en CAMHB ( $1,5 \times 10^6$  UFC/ml). Dentro de los 15 minutos, se debe inocular 25µl del inóculo diluido en cada pocillo de la policubeta utilizando algún dispositivo adecuado (pipeta automática mono o multicanal). De esta manera el volumen final en cada pocillo de la policubeta será de 50µl: 25µl de antibiótico + 25µl de inóculo bacteriano (inóculo final  $7,5 \times 10^5$  UFC/ML).

Para evitar la desecación durante la incubación, se debe sellar cada policubeta individualmente o en pilas de 4 en una bolsa plástica con su tapa plástica o película plástica autoadhesiva. Incubar las policubetas inoculadas a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 16-20hs en estufa.

#### Lectura de los resultados:

Leer la CIM como la menor concentración de antibiótico capaz de inhibir completamente el desarrollo bacteriano en el pocillo de microdilución, definido a ojo desnudo. Alternativamente para la lectura y registro de resultados del método de microdilución se puede utilizar un dispositivo lector que pueda discernir el crecimiento bacteriano en el pocillo.

Para determinar el punto final de desarrollo, debe compararse cada pocillo que contiene antibiótico con el pocillo control de crecimiento (sin antibiótico).

#### **Anexo:**

##### ***Preparación de CAMHB***

Utilizar la base de caldo de Mueller-Hinton (MHB) deshidratado comercialmente disponible. Existen dos formas:

- MHB ya ajustado en cationes por el fabricante: CAMHB.
- MHB sin agregado de cationes, en cuyo caso el contenido de cationes es generalmente inadecuado.

La primera fórmula no requiere un ajuste adicional de cationes, si se prepara de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Para la segunda preparar MHB de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, autoclavar, y enfriar antes de agregar los cationes. **Las concentraciones finales necesarias son: 20 a 25 mg de  $\text{Ca}^{++}$ /l y 10 a 12,5 mg de  $\text{Mg}^{++}$ /l.**

##### ***Soluciones stock de cationes $\text{Ca}^{+2}$ y $\text{Mg}^{+2}$ .***

1. Para preparar una solución stock de magnesio, se disuelven 8,36 g de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en 100 ml de solución de agua desionizada. Esta solución contiene 10 mg de  $\text{Mg}^{++}$ /ml.
2. Para preparar una solución stock de calcio, se disuelven 3,68 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en 100 ml de solución de agua desionizada. Esta solución contiene 10 mg de  $\text{Ca}^{++}$ /ml.
3. Esterilizar por filtración de membrana y almacenar entre 2 y 8 ° C.

##### Referencias:

- CLSI M7-A10, 2015. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard.
- CLSI M100, 27th Edition, 2017. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.