

MÉTODO DE ELUSIÓN DE DISCOS DE COLISTÍN



Adaptado por el Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) del Protocolo Original de la Universidad de California en Los Angeles (UCLA), USA.

Versión 3 – Noviembre 2017

Consideraciones generales

El objetivo de este método es medir la actividad in vitro de colistín (COL) frente a un aislamiento bacteriano. Se fundamenta en el agregado de discos de COL a tubos con caldo Müller Hinton ajustado en cationes (CAMHB por su sigla en inglés) para obtener concentraciones de COL de 1, 2 y 4 µg/ml. Luego de la inoculación de los mismos con un inóculo bacteriano estándar, se incuban over night y se determina la CIM como la menor concentración de COL que inhibe el crecimiento bacteriano.

Este método se puede realizar en tubos con 10ml de CAMHB según el método original (Macrométodo) o en tubos de 1ml (Micrométodo) fraccionando las soluciones del Macrométodo para optimizar el rendimiento (pueden evaluarse hasta diez aislamientos).

Materiales

- Solución Fisiológica (SF) (0.9% NaCl).
- CAMHB (tubos de vidrio con 10 ml).
- Discos de COL 10 µg.
- 0.5 McFarland estándar de turbidez.
- Estufa (35± 2°C).
- Micropipeta graduable y tips estériles.
- Ansa calibrada de 10 µl.

Control de Calidad

Cepa de control de Calidad: M19736, **CIM COL esperada: ≥4 µg/ml** o en su defecto cualquier aislamiento que previamente haya dado CIM a COL ≥4µg/ml por el método de referencia y un control negativo (*P. aeruginosa* ATCC 27853, CIM COL: 0.5 – 4 µg-ml o *E. coli* ATCC 25922 CIM COL: 0.25 – 2 µg-ml).

MACROMETODO:

A. Preparación de los tubos con COL (volumen final 10 ml):

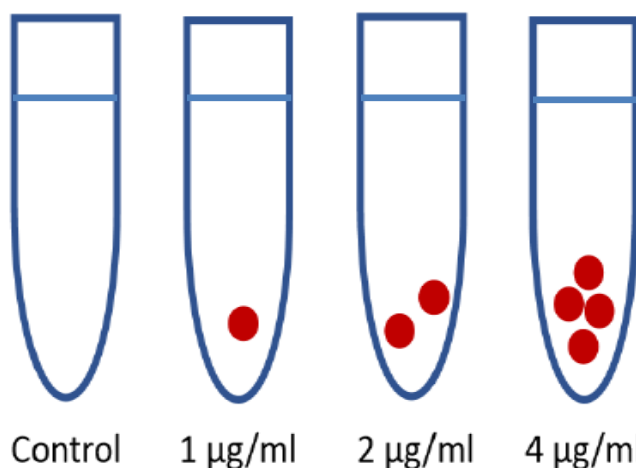
1. Rotular 4 tubos de vidrio para cada aislamiento como 1, 2, 4 ug/ml y Control. Colocar 10 ml de CAMHB en cada tubo.
2. Agregar en forma aséptica 1 disco de COL al tubo rotulado como "1", 2 discos al tubo "2" y 4 discos al tubo "4" µg/ml.
3. Permitir que el COL eluya de los discos por al menos media hora a temperatura ambiente.

B. Procedimiento:

1. A partir del crecimiento over night en una placa de medio de cultivo sin antibiótico, preparar un inóculo del aislamiento a investigar en SF con una turbidez equivalente al 0.5 Mc Farland (aproximadamente 1.5×10^8 UFC/ml).

2. Agregar 50 μ l del inóculo a cada uno de los cuatro tubos (1, 2, 4 y control) (concentración final 7.5×10^5 CFU/ml, aprox).
 3. Mezclar cada tubo suavemente (para evitar la pérdida de COL por pegado a la superficie de vidrio sobre el menisco o a la tapa) e incubar en estufa a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18-20 horas.
- D. Lectura e interpretación:
1. Examinar el tubo control: se debe observar turbidez para validar la prueba.
 3. Leer la CIM como la menor concentración en la que no se observa turbidez.
 4. Interpretar el resultado como **sensible a COL si la CIM es ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ o resistente si la CIM es ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$.**

MÉTODO DE ELUCIÓN DE DISCOS DE COLISTÍN MACROMETODO



- Agregar 1, 2 y 4 discos de COL a tubos con 10ml de CAMHB.
- Agregar 50 μ l del 0.5 Mc Farland
- Incubar 16-20hs

MICROMETODO (adaptación del LNR):

- A. Preparación de los tubos con COL (volumen final 1ml):
1. Preparar los 4 tubos como en la sección A (puntos 1 y 2) del Macrométodo.
 2. Permitir que el COL eluya de los discos por al menos **1 hora a temperatura ambiente.**
 3. **Homogeneizar con una pipeta el contenido del tubo rotulado como "1" y fraccionarlo en diez tubos de vidrio con tapa a rosca (o similar que permita el almacenamiento) dispensando 1ml de la solución en cada tubo. Rotular como "1" a cada uno de los diez tubos fraccionados. Proceder de la misma manera con los tubos "2", "4" y "control".**
 4. **Conservar los tubos a -20°C , debidamente cerrados para evitar la evaporación.**
- B. Procedimiento:
1. Retirar los tubos del freezer y esperar a que tomen temperatura ambiente.
 2. A partir del crecimiento over night en una placa de medio de cultivo sin antibiótico, preparar un inóculo del aislamiento a investigar en SF con una turbidez equivalente al 0.5 McFarland (aproximadamente 1.5×10^8 UFC/ml).

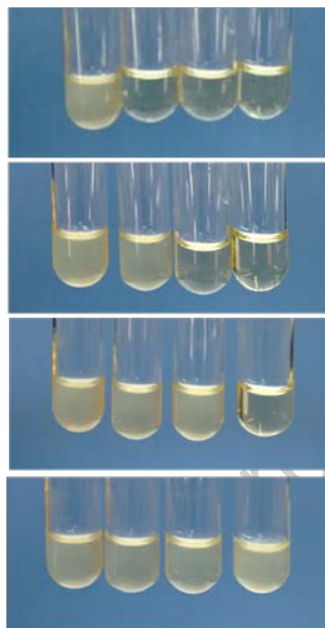
3. Agregar, con micropipeta, **5 µl del inóculo** a cada uno de los cuatro tubos (1, 2, 4 y control) (concentración final 7.5×10^5 CFU/ml, aproximadamente) (**ver Nota**).
4. Mezclar cada tubo suavemente (para evitar la pérdida de COL por pegado a la superficie de vidrio sobre el menisco o a la tapa) e incubar en estufa a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 16-20 horas.

Nota: Si no se dispone de una micropipeta que dispense 5 µl, se puede diluir el inóculo equivalente a 0.5 Mc Farland al medio y posteriormente agregar a cada tubo, 10 µl utilizando ansa calibrada.

C. Lectura e interpretación (Ver foto):

1. Examinar el tubo control: se debe observar turbidez para validar la prueba.
2. Leer la CIM como la menor concentración en la que no se observa turbidez.
3. Interpretar el resultado como:
SENSIBLE a COL si la CIM ES ≤ 2 UG/ML o RESISTENTE si la CIM ES ≥ 4 UG/ML.

INTERPRETACION



SENSIBLE

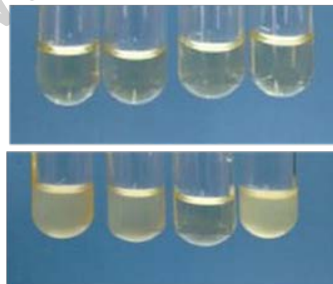
SENSIBLE

RESISTENTE

RESISTENTE

TC 1 2 4

INTERPRETACION



INVALIDO

No enturbia el control de crecimiento (TC)

INVALIDO

Tubo salteado

Abreviaturas: TC: Tubo control, 1: tubo con 1 ug/ml de COL, 2: tubo con 2 ug/ml de COL, 4: tubo con 4 ug/ml de COL.

ACLARACIONES:

1. Si se obtienen tubos salteados (crecimiento a concentraciones mayores con uno a más tubos límpidos a concentraciones menores) se debe repetir la prueba. Esto podría deberse a:
 - Contaminación en la dilución mayor.
 - Inadecuada inoculación de los tubos.
 - Aislamientos heterorresistentes.
 - Concentración inadecuada de COL en los tubos.
2. Chequear el crecimiento de cada tubo, si se observa algún patrón de crecimiento inesperado, confirmarlo realizando un control de pureza del tubo sospechoso.
3. **Acinetobacter spp. Debe incubarse por 24hs.**
4. **Pseudomonas aeruginosa debe incubarse por 18hs.**
5. El contenido de COL en los discos puede variar de un fabricante a otro. Si se utilizan diferentes lotes o marcas de discos se deben controlar con las cepas de control de calidad.
6. Como control de calidad del micrométodo se sugiere ensayar un control positivo y negativo cada vez que se prepara un lote de diez determinaciones.

Evaluación del **Método de Elución de Discos de Colistín** en el Laboratorio Nacional de Referencia (LNR):

Para evaluar el Macrométodo y el Micrométodo, se compararon los resultados de ambos métodos 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). Se evaluó el Macrométodo con aislamientos de Enterobacterias y *P. aeruginosa* mostraron resultados satisfactorios. En la evaluación del Micrométodo se incluyeron 95 aislamientos clínicos (48 R a colistín): 40 Enterobacterias, 20 *P. aeruginosa* y 25 *Acinetobacter spp.*

Grupo Bacteriano	Método de referencia	Elución : Micrométodo		
		%CA	%VME (Falsa S)	%ME (Falsa R)
<i>Acinetobacter spp.</i>	BMD (CLSI)	100	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BMD (CLSI)	100	0	0
Enterobacterias	BMD (CLSI) y PCR <i>mcr-1</i>	98%	2.1	0

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

Referencia:

Junio 2017. Colistin Broth Disk Elution Test, Universidad de California en Los Angeles (UCLA), USA.