

## Discos Múltiples IVD

Para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos por difusión en agar.

### INTRODUCCIÓN

La susceptibilidad bacteriana a los antimicrobianos puede medirse in vitro utilizando los principios de la difusión en agar, mediante el uso de discos de papel impregnados con soluciones de distintos antimicrobianos.

### USO AL QUE ESTA DESTINADO

Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos por difusión en agar.

### FUNDAMENTO

El fundamento de esta técnica (Bauer y Kirby) se basa en la obtención de halos de inhibición que se correlacionan con la concentración inhibitoria mínima (CIM) y el comportamiento clínico de las cepas bacterianas como: "Sensibles", "Intermedios" y "Resistentes". Por lo tanto si se desean resultados confiables, los detalles técnicos deben ser cuidadosamente normatizados y controlados. De acuerdo con los informes de la O.M.S. y C.L.S.I.

### ELEMENTOS DEL SISTEMA

**Provisto** [Ver Series](#)

Discos de 5 puntas impregnados con distintos antimicrobianos. (Variable de acuerdo a cada Serie)

**No provisto**

- Agar Muller Hinton.
- Caldo Tripto Soya.
- Patrón de turbidez.
- Cepas patrones.

### MATERIAL REQUERIDO

**Provisto**

Regla calibre

**No provisto**

- Ansa.
- Mechero.
- Estufa de cultivo.
- Tubos estériles.
- Hisopos estériles.
- Pinza.
- Placas de petri.

### ESTABILIDAD Y CONSERVACIÓN

Los elementos del sistema provistos son estables hasta la fecha de vencimiento indicada en el envase, mantenidos por debajo de  $-20^{\circ}\text{C}$  y en su envase original.

### PROCEDIMIENTO

#### DISCOS

Si bien ANMAT recomienda no utilizar más de 6 antimicrobianos por placa de 10 cm de diámetro, **Brizuela-Lab.** rediseño sus discos múltiples incorporando sólo 5 antibióticos para lograr de esta manera adaptarlos a los nuevos criterios bacteriológicos internacionales vigentes (Manual of Clinical Microbiology 7<sup>ª</sup> edición 1999) que recomiendan el uso de sólo 5, separados a una distancia mayor a 2,4 cm entre centros. En las nuevas estrellas se cumplen todas las recomendaciones y se obtiene una separación entre centros de 3,1 cm.

Con esto se logra evitar la interacción entre antimicrobianos y obtener halos completos dentro de la placa.

La conservación de los mismos es muy importante para obtener un resultado confiable. Se deberán conservar a la temperatura que indique el envase y previamente se deben dejar que tomen temperatura ambiente durante 1 ó 2 horas, para evitar la condensación

que pueda ocurrir. No se deberá usar discos cuyo vencimiento haya expirado.

#### MEDIO DE CULTIVO

Se deberá usar agar Muller Hinton, pues este medio proporciona una buena reproductibilidad lote a lote, es pobre en contenido de inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclinas. Además, brinda crecimiento satisfactorio para muchos patógenos. El contenido excesivo de timidina, puede causar la obtención de halos de inhibición menores, cuando se ensaya con Trimetoprima.

Para evaluar el contenido de timidina en un lote de agar Muller Hinton se puede usar una cepa control de *S. faecalis* ATCC 29212, con discos de Trimetoprima. Medios con contenido satisfactorio de timidina, darán zonas claras de inhibición mayor a 24 mm.

El pH del medio deberá estar entre 7,2 - 7,4 ( $25^{\circ}\text{C}$ )

#### INOCULO

La suspensión de gérmenes que habrá de utilizarse para la realización de la prueba deberá provenir de cultivos monomicrobianos. Para la correcta preparación del inóculo se deberá comparar con un patrón de turbidez el cual se prepara mezclando 0.5 ml de una solución de  $\text{Cl}_2\text{Ba}$  (48 mmol/L) y 99,5 ml de una solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (180 mmol/L). Este patrón de turbidez puede fraccionarse en tubos, similares a los que se utilizarán para la preparación del inóculo, se cerrarán perfectamente y se deberán conservar refrigerado durante un periodo de 6 meses. Antes de ser utilizado de deberá agitarse antes de proceder a la comparación.

Para la preparación del inóculo se tomarán 4 ó 5 colonias del germen en estudio y se suspenderán en una porción de caldo Tripto Soya, hasta lograr una turbidez, a ojo desnudo, comparable al patrón de turbidez. En caso de obtener una suspensión con turbidez menor al patrón se podrá incubar a  $37^{\circ}\text{C}$ , durante algunas horas, hasta igualar a la turbidez del patrón.

En caso de que el inóculo sea de concentración menor a la referida se obtendrán halos mayores y viceversa.

#### PREPARACIÓN DE LAS PLACAS

La altura de la capa de agar deberá ser de 4 mm aproximadamente, una vez colocado el agar se tapan y se dejará solidificar el agar y se procederá al secado de las mismas para retirar el exceso de humedad, para lo cual se colocarán invertidas en estufa a  $37^{\circ}\text{C}$ , durante 10 a 30 minutos.

Pueden conservarse durante 7 días, refrigeradas, teniendo la precaución de evitar la evaporación.

#### INOCULACION DE LAS PLACAS

Existen varias técnicas estandarizadas para la aplicación del inóculo, pero la más sencilla es por escobilladura, para lo cual se embebe un hisopo estéril en la suspensión previamente preparada, se elimina el exceso de líquido haciendo rotar el hisopo contra la pared del tubo y se aplica sobre la superficie de la placa efectuando un barrido en por lo menos tres direcciones, girando el hisopo en cada dirección.

#### APLICACIÓN DE LOS DISCOS

Aplicar los discos con la ayuda de una pinza estéril ejerciendo una ligera presión sobre la superficie del medio. Debido a la rápida difusión del antimicrobiano, no se deberá mover el disco una vez colocado en la placa.

#### INCUBACION DE LAS PLACAS

Antes de los 15 minutos de aplicados los discos, se deberá comenzar la incubación a  $35 - 37^{\circ}\text{C}$ , durante 18 a 24 horas.

#### LECTURA DE LOS DIAMETROS

Luego de la incubación de las placas se procederá a la lectura de los halos de inhibición, con la ayuda de un calibre o regla se medirá el diámetro de la zona de inhibición completa.

### EXPRESION DE LOS RESULTADOS

De acuerdo a los diámetros obtenidos se informarán como Sensibles, Intermedios o Resistentes, según corresponda, basado en la siguiente [Tabla de Interpretación de Resultados](#) (C.L.S.I.)

### LIMITACIONES Y CUIDADOS

Si los Discos no se mantienen dentro del rango de temperatura, indicado en el envase, y no se protegen adecuadamente de la humedad, pueden inutilizarse, arrojando resultados falsos resistentes.

- No utilizar discos cuyo vencimiento haya expirado.
- Utilizar sólo medio de cultivo Muller Hinton, ajustando su pH y controlando la concentración de timidina. El uso de otros medios de cultivo pueden inducir a error.
- El espesor de la capa de agar deberá ajustarse a 4 mm. Una capa demasiado delgada, producirá halos de inhibición más amplios y viceversa.
- La turbidez del inóculo se deberá estandarizar correctamente, pues un inóculo de menor turbidez determinará halos de inhibición más grandes y viceversa.

### CONTROL DE CALIDAD

Cuando puedan existir dudas acerca de los resultados obtenidos en los ensayos de rutina, pueden efectuarse pruebas con cepas de referencia. Los resultados obtenidos deberán estar comprendidos dentro de los rangos que correspondan a dichas cepas. Las cepas patrones son las siguientes:

*Escherichia coli* ATCC 25922 - *Estafilococo aureus* ATCC 25923 - *Pseudomona aureginosa* ATCC 27853 y la *Escherichia coli* ATCC 35218. Esta última se deberá ensayar con los discos que poseen combinaciones de betalactámicos y de inhibidores de betalactamasa.

### BIBLIOGRAFIA

- Barry, A.L.; García, F. (1970)
- Amer. J. Clin. Pathol. 53,149-158
- Bauer, A. W.; Kirby, V. M.; Sherris, J. C. (1966)
- Amer. J. Clin. Pathol. 45,493-496
- Coyle, M. B. Lampe, M. F. Sherris J. C. (1976)
- Antimicrob. Agents Chemother 10, 436-440
- Ericsson, H. M. ; Sherris, J. C. (1971)
- Acta Pathol. Microbiol. Scand. Section B, Suppl. 217, 1-90
- NCCLS 1979-1982-1993-1997
- WHO Expert committee on Biological Standardization (1971)
- Technical Report Series Nº 610, 98-128
- OMS Series de Informes Técnicos Nº 210-1961
- Manual of Clinical Micro-biology 7° edición 1999

### PRESENTACION

Gram Negativos Serie A	25 y 50 discos.
Gram Negativos Serie B	25 y 50 discos.
Gram Negativos Serie C	25 y 50 discos.
Gram Negativos Serie A+B+C	75 discos.
Gram Positivos Serie A+B	26 y 50 discos.
IU Pediátrico	25 y 50 discos.
IU Adulto Ambulatorio Serie A+B	26 y 50 discos.
IU Hospitalario Serie A+B	26 y 50 discos.

Producto elaborado por

Laboratorios W. Brizuela S.A.

Av. Figueroa Alcorta 123/139- 5000 Córdoba (Argentina)

info@brizuela-lab.com.ar

www.brizuela-lab.com.ar

Director Técnico: Marcelo Brizuela

Producto Autorizado ANMAT Nº 192.

## Composición de las Distintas Series

### Gram Negativos

#### Serie A

Cefotaxima (CTX) (10 µg)  
Ceftazidima (CAZ) (30 µg)  
Piperac./Tazob. (PTZ)(100/10µg)  
Imipenem (IMP) (10µg)  
Amoxic./Clavul. (AMC)(20/10 µg)

#### Serie B

Amicacina (AN) (30 µg)  
Gentamicina (GM)(10 µg)  
Ampicilina (AM)(10/10 µg)  
Cefalotina (CF) (30µg)  
Cloramfenicol (C)(30 µg)

#### Serie C

Colistina (CS) (10 µg)  
Piperacilina (PIP) (100 µg)  
Ciprofloxacina (CIP) (5 µg)  
Ampic./Sulb. (AMS)(10/10 µg)  
Trimetop./Sulfam. (SXT) (1,25/23,75 µg)

### Gram Positivos

#### Serie A

Penicilina (P)(10U)  
Oxacilina (OX) (1 ug)  
Vancomicina (VA) (30 ug)  
Ciprofloxacina (CIP) (5 ug)  
Amoxic./Clavul. (AMC) (20/10 ug)

#### Serie B

Eritromicina(ERY) (15 ug)  
Clindamicina (CLI) (2 ug)  
Rifampicina (RA) (5ug)  
Trimet./Sulf.(SXT) (1,25/23,75 ug)  
Gentamicina (GM)(10 ug)

#### I.U. Pediátrico

Amicacina (AN) (30 ug)  
Gentamicina (GM) (10 ug)  
Cefalotina (CF)(30 ug)  
Trimet./Sulf. (SXT) (1,25/23,75 ug)  
Nitrofurantoína (FT) (300 ug)

### I.U. Ambulatorio

#### Serie A

Amoxi/Clavulanico (AMC) (20/10 ug)  
Ciprofloxacina (CIP) (5 ug)  
Ampicilina (AM) (10 ug)  
Trimet./Sulf. (SXT) (1,25/23,75 ug)  
Fosfomicina (FOS) (50 ug)

#### Serie B

Gentamicina (GM) (10 ug)  
Cefalotina (CF) (30 ug)  
Nitrofurantoína (FT) (300 ug)  
Norfloxacina (NOR) (10 ug)  
Ampic/Sulbac. (AMS) (10/10 ug)

### I.U. Hospitalario

#### Serie A

Amicacina (AN) (30 ug)  
Gentamicina (GM) (10 ug)  
Ampic./Sulb.(AMS) (10/10 ug)  
Fosfomicina (FOS) (50 ug)  
Cefalotina (CF)(30 ug)

#### Serie B

Cefotaxima (CTX) (30 ug)  
Nitrofurantoína (FT) (300 ug)  
Amoxi/Clavulanico (AMC) (20/10 ug)  
Piperac./Tazobac. (PTZ) (100/10 ug)  
Ciprofloxacina (CIP) (5 ug)

**TABLA DE INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS**  
**Método de difusión en agar (Normas CLSI - Año 2015)**

(Para antimicrobianos contenidos en Discos Múltiples y Monodiscos de Brizuela-Lab.)

AGENTE ANTIMICROBIANO	CARGA	RESISTENTE < o = (mm)	INTERMEDIO (mm)	SENSIBLE > o = (mm)
<b>AMICACINA</b> <i>Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter spp, Staphylococcus spp.</i>	<b>30 µg</b>	14	15-16	17
<b>AMOXICILINA/CLAVULANICO</b> <i>Haemophilus spp.</i> <i>Enterobacteriaceae.</i>	<b>20/10 ug</b>	19 13	- 14-17	20 18
<b>AMPICILINA</b> <i>Enterobacteriaceae.</i> <i>Enterococcus spp.</i> <i>Haemophilus spp.</i> <i>Streptococcus spp- Grupo β-hemolítico.</i>	<b>10 µg</b>	13 16 18 -	14-16 - 19-21 -	17 17 22 24
<b>AMPICILINA/ SULBACTAM</b> <i>Enterobacteriaceae .</i> <i>Haemophilus spp.</i> <i>Acinetobacter spp.</i>	<b>10/10 µg</b>	11 19 11	12-14 - 12-14	15 20 15
<b>AZTREONAM</b> <i>Enterobacteriaceae.</i> <i>Pseudomonas aeruginosa.</i> <i>Haemophilus spp.</i>	<b>30 µg</b>	17 15 -	18-20 16-21 -	21 22 26
<b>CEFALOTINA</b> <i>Enterobacteriaceae.</i>	<b>30 ug</b>	14	15-17	18
<b>CEFOTAXIMA</b> <i>Enterobacteriaceae.</i> <i>Acinetobacter spp.</i> <i>Haemophilus spp.</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Streptococcus spp Grupo β-Hemolítico.</i> <i>Streptococcus spp Grupo Viridans.</i> <i>Neisseria meningitidis.</i>	<b>30 ug</b>	22 14 - - - 25 -	23-25 15-22 - - - 26-27 -	26 23 26 31 24 28 34
<b>CEFTAZIDIMA</b> <i>Enterobacteriaceae, Burkholderia cepacia.</i> <i>Pseudomonas aeruginosa , Acinetobacter spp.</i> <i>Haemophilus spp.</i> <i>Neisseria gonorrhoeae.</i>	<b>30 ug</b>	17 14 - -	18-20 15-17 - -	21 18 26 31
<b>CEFTRIAXONA</b> <i>Enterobacteriaceae.</i> <i>Acinetobacter spp.</i> <i>Haemophilus spp.</i> <i>Neisseria gonorrhoeae.</i> <i>Streptococcus spp Grupo Viridans.</i> <i>Neisseria meningitidis.</i> <i>Streptococcus spp. Grupo β-Hemolítico.</i>	<b>30 ug</b>	19 13 - - 24 - -	20-22 14-20 - - 25-26 - -	23 21 26 35 27 34 24
<b>CEFUROXIMA (Parenteral)</b> <i>Enterobacteriaceae.</i> <i>Haemophilus spp.</i> <i>Neisseria gonorrhoeae.</i>	<b>30 ug</b>	14 16 25	15-17 17-19 26-30	18 20 31
<b>CEFUROXIMA (Oral)</b> <i>Enterobacteriaceae.</i> <i>Haemophilus spp.</i>		14 16	15-22 15-17	23 18
<b>CIPROFLOXACINA</b> <i>Enterobacteriaceae (Excepto Salmonella spp) ,Pseudomonas aeruginosa , Acinetobacter spp , Staphylococcus spp , Enterococcus spp.</i>		15	16-20	21

<i>Salmonella spp.</i>	<b>5 ug</b>	20	21-30	31
<i>Haemophilus spp.</i>		-	-	21
<i>Neisseria gonorrhoeae.</i>		27	28-40	41
<i>Neisseria meningitidis.</i>		32	33-34	35
<b>CLINDAMICINA</b>				
<i>Staphylococcus spp.</i>	<b>2 ug</b>	14	15-20	21
<i>Streptococcus pneumoniae, Streptococcus spp. Grupo β-Hemolítico, Streptococcus spp. Grupo Viridans.</i>		15	16-18	19
<b>CLORAMFENICOL</b>				
<i>Enterobacteriaceae, Enterococcus spp, Staphylococcus spp.</i>	<b>30 ug</b>	12	13-17	18
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		20	-	21
<i>Streptococcus spp. Grupo β-Hemolítico, Streptococcus spp. Grupo Viridans.</i>		17	18-20	21
<i>Neisseria meningitidis.</i>		19	20-25	26
<i>Haemophilus spp.</i>		25	26-28	29
<b>COLISTINA</b>				
<i>Pseudomonas aeruginosa.</i>	<b>10 ug</b>	10	-	11
<b>ERITROMICINA</b>				
<i>Staphylococcus spp, Enterococcus spp.</i>	<b>15 ug</b>	13	14-22	23
<i>Streptococcus pneumoniae, Streptococcus spp Grupo β-Hemolítico, Streptococcus spp Grupo Viridans.</i>	<b>15 ug</b>	15	16-20	21
<b>ESTREPTOMICINA ALTA CARGA</b>				
<i>Enterococcus spp (Alta Resistencia).</i>	<b>300 ug</b>	6	7-9	10
<b>FOSFOMICINA (*) (**)</b>				
<i>Enterobacteriaceae.</i>	<b>50 ug</b>	12	13-14	15
<b>FOSFOMICINA ALTA CARGA (*)</b>				
<i>Enterobacteriaceae (Sólo E.coli de tracto urinario).</i>	<b>200 ug</b>	12	13-15	16
<b>IMIPENEM</b>				
<i>Enterobacteriaceae.</i>	<b>10 ug</b>	19	20-22	23
<i>Pseudomonas aeruginosa.</i>		15	16-18	19
<i>Acinetobacter spp.</i>		18	19-21	22
<i>Haemophilus spp.</i>		-	-	16
<b>GENTAMICINA</b>				
<i>Enterobacteriaceae (Excepto Salmonella spp y Shigella spp) Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter spp, Staphylococcus spp.</i>	<b>10 ug</b>	12	13-14	15
<b>GENTAMICINA ALTA CARGA</b>				
<i>Enterococcus spp (Alta Resistencia).</i>	<b>120 ug</b>	6	7-9	10
<b>NALIDIXICO ACIDO</b>				
<i>Enterobacteriaceae.</i>	<b>30 ug</b>	13	14-18	19
<b>NITROFURANTOINA</b>				
<i>Enterobacteriaceae, Staphylococcus spp, Enterococcus spp.</i>	<b>300 ug</b>	14	15-16	17
<b>NORFLOXACINA</b>				
<i>Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus spp, Enterococcus spp.</i>	<b>10 ug</b>	12	13-16	17
<b>OXACILINA</b>				
<i>Streptococcus pneumoniae.</i>	<b>1 ug</b>	-	-	20
<b>PENICILINA</b>				
<i>Staphylococcus spp.</i>	<b>10 U.</b>	28	-	29
<i>Enterococcus spp.</i>		14	-	15
<i>Neisseria gonorrhoeae.</i>		26	27-46	47
<i>Streptococcus spp Grupo β-Hemolítico.</i>		-	-	24
<b>PIPERACILINA</b>				
<i>Enterobacteriaceae, Acinetobacter spp.</i>	<b>100 ug</b>	17	18-20	21
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		14	15-20	21
<b>PIPERACILINA/TAZOBACTAM</b>				
<i>Enterobacteriaceae, Acinetobacter spp.</i>	<b>100/10 ug</b>	17	18-20	21
<i>Pseudomonas aeruginosa.</i>		14	18-20	21
<i>Haemophilus spp.</i>		-	-	21
<b>RIFAMPICINA</b>				



<i>Staphylococcus ssp</i> , <i>Enterococcus ssp</i> , <i>Haemophilus ssp</i> . <i>Streptococcus pneumoniae</i> . <i>Neisseria meningitidis</i> .	<b>5 ug</b>	16 16 19	17-19 17-18 20-24	20 19 25
<b>TETRACICLINA</b> <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Acinetobacter ssp</i> . <i>Staphylococcus ssp</i> , <i>Enterococcus ssp</i> . <i>Haemophilus ssp</i> . <i>Neisseria gonorrhoeae</i> . <i>Streptococcus pneumoniae</i> . <i>Streptococcus ssp</i> Grupo $\beta$ -Hemolítico, <i>Streptococcus ssp</i> Grupo Viridans.	<b>30 ug</b>	11 14 25 30 24 18	12-14 15-18 26-28 31-37 25-27 19-22	15 19 29 38 28 23
<b>TRIMETOPRIMA/SULFAMETOXAZOL</b> <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Acinetobacter ssp</i> , <i>Burkholderia cepacia complex</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Staphylococcus ssp</i> , <i>Haemophilus ssp</i> . <i>Streptococcus pneumoniae</i> . <i>Neisseria meningitidis</i> .	<b>1.25/ 23.75 <math>\mu</math>g</b>	10 15 25	11-15 16-18 26-29	16 19 30
<b>VANCOMICINA</b> <i>Enterococcus ssp</i> . <i>Streptococcus ssp</i> . Grupo $\beta$ -Hemolítico, <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Streptococcus ssp</i> Grupo Viridans.	<b>30 ug</b>	14 -	15-16 -	17 17
(*) Contiene 50 ug de glucosa-6-fosfato.				
(**) No hay información por parte del CLSI, para este antimicrobiano, los datos fueron tomados de Pateran y col. ( J Infect Dev Ctries 2012; 6(5):452-456.)				