

## Monodiscos

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 ESTÁ 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

- Discos de 6 mm de diámetro impregnados con distintos antimicrobianos. Los discos de **Brizuela-Lab** vienen impresos de ambas caras, con indicación de potencia y siglas. [Ver Listado](#).

#### No provisto

- Agar Mueller 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. La cantidad necesaria para el trabajo diario puede mantenerse a  $0-10^{\circ}\text{C}$  por una semana.

### PROCEDIMIENTO

#### DISCOS

No utilizar más de 5 discos por placas, separados a una distancia mínima de 2,4 cm. y alejados del borde de la placa a más de 1 cm. 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 Mueller 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 conte-

nido 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 Mueller 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 ( $25^{\circ}\text{C}$ ).

#### INÓCULO

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. Al ser utilizado 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 en las placas, se tapanán, 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.

#### INOCULACIÓN 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.

#### INCUBACIÓN 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 DIÁMETROS

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.

#### EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

De acuerdo a los diámetros obtenidos se informarán como Sensibles, Intermedios o Resistentes, según corresponda, basado en las tablas publicadas en el C.L.S.I. M100 *Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing, 30th Edition*.

<https://clsi.org/standards/products/free-resources/access-our-free-resources/>

#### 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 Mueller 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 - *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Escherichia coli* ATCC 35218.

Esta última se deberá ensayar con los discos que poseen combinaciones de betalactámicos e inhibidores de betalactamasas.

#### BIBLIOGRAFÍA

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI); "*M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*", 30th Edition; 2020.
- Jorgensen, J.H.; Pfaller, M.A.; Carroll, K.C.; Funke, G.; Landry, M.L.; Richter, S.S.; Warnock, D.W. "*Manual of Clinical Microbiology*", Eleventh Edition; 2015.
- Bauer, A. W.; Kirby, V. M.; Sherris, J. C. (1966).
- OMS Series de Informes Técnicos N° 210-1961.
- Manual of Clinical Microbiology 11° edición 2015.

#### PRESENTACIÓN

Envases x 50 discos.

Ver Listado de Monodiscos: [www.brizuela-lab.com.ar](http://www.brizuela-lab.com.ar)

Producto elaborado por Laboratorios W. Brizuela S.A. Falucho 59 (X5002HMA) - Córdoba, Argentina.

[info@brizuela-lab.com.ar](mailto:info@brizuela-lab.com.ar)

Producto Autorizado ANMAT Disp. N° 6341/8048.

Director Técnico: Marcelo Brizuela.