

Monodiscos para Antibiograma

Discos utilizados en las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos por el método de difusión en Mueller Hinton Agar (adaptada de Kirby Bauer y cols).

CONTENIDO Y COMPOSICIÓN

Las características y la composición de los discos es la recomendada y emitida por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Estados Unidos de Norteamérica. Son discos de papel de 6 mm de diámetro impregnados con antimicrobianos. Hay disponible una amplia variedad de configuraciones de discos que corresponden a un determinado antimicrobiano y a una determinada carga por disco. Los discos están codificados con letras y números para identificarlos por su composición.

Cada configuración se encuentra disponible como:

- 1 (un) envase por 50 discos. Para realizar 50 determinaciones.
- 3 (tres) envases por 50 discos cada uno. Permite realizar 150 determinaciones.
- 4 (cuatro) envases por 50 discos cada uno. Permite realizar 200 determinaciones.
- 5 (cinco) envases por 50 discos cada uno. Permite realizar 250 determinaciones.
- 10 (diez) envases por 50 discos cada uno. Permite realizar 500 determinaciones.

INSTRUCCIONES

Productos listos para usar, de Uso in Vitro y Uso Profesional Exclusivo.

ALMACENAMIENTO

Entre -20° y 0°C.

Los discos pueden mantenerse refrigerados entre 2 a 8 °C, por un tiempo no mayor a siete días.

PROCEDIMIENTO

Realizar la Prueba de Sensibilidad a los Antimicrobianos en Mueller Hinton Agar según las normas vigentes emitidas por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). El personal debe estar capacitado y calificado para la tarea a realizar. Se debe trabajar mediante técnicas asepticas.

a) Medio de cultivo a utilizar: Mueller Hinton Agar.

Debe controlarse que el pH del mismo se encuentre entre 7.2 y 7.4 y que el espesor del medio de cultivo sea de 4.0 ± 0.5 mm. En caso de tener que preparar el medio de cultivo y distribuirlo en placas de Petri estériles, considerar lo siguiente:

- **Volumen del medio por placa:** verter de 25 a 30 ml de Mueller Hinton Agar (el cual se encuentra estéril, fundido y enfriado a 50-55°C) en placas de Petri estériles de 90 mm de diámetro para obtener una capa de 4.0 ± 0.5 mm de espesor. Es fundamental respetar esta condición, pues de lo contrario, se obtendrán halos mayores (a menor espesor del agar) o halos menores (a mayor espesor del agar).
- **Superficie del medio de cultivo:** la superficie del Mueller Hinton Agar debe estar seca previo al uso. No se deben visualizar gotas de agua en el medio de cultivo ni en la tapa de las placas. En caso de ser necesario, secar las placas a 33 - 37 °C durante 10 a 30 minutos o sobre flujo laminar (hasta eliminar toda gota de agua presente). No sobresecar las placas.

b) Muestra:

Condiciones de los cultivos originales: realizar el antibiograma a partir de cultivos monomicrobianos de las cepas en estudio. **Preparación del inóculo bacteriano:** puede ser realizada mediante una de las dos técnicas descritas a continuación. La técnica a utilizar depende del microorganismo a analizar. Es necesario consultar las normas vigentes emitidas por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Tomar de 3 a 5 colonias del cultivo original de toda la noche (incubación 18 a 24 horas) con un ansa o hisopo estéril, depositar en 3 - 5 ml de solución fisiológica y ajustar la turbidez a la equivalente del tubo 0.5 de la escala de Mc Farland. Alternativamente a este método se puede realizar el método de crecimiento previo, cuando se dispone de cultivos puros monomicrobianos de más de 24 horas en medios sólidos. En este caso tomar de 3 a 5 colonias aisladas y realizar la suspensión en caldo tripteína soya o infusión cerebro corazón. Incubar el caldo en aerobiosis a 33° - 37°C de 1 hora a 6 horas hasta alcanzar o exceder la turbidez equivalente del tubo 0.5 de la escala de Mc Farland. Luego retirar los tubos de la estufa y en caso de ser necesario ajustar al estándar 0.5 de Mc Farland con solución fisiológica. Esta técnica no se aplica a todos los microorganismos (ejemplo no aplica a Staphylococcus aureus entre otros).

Importante: el tubo 0.5 de la escala de Mc Farland se prepara añadiendo 0.5 ml de 0.048 M BaCl2 (1.175 % p/v BaCl2 2 H2O) a 99.5 ml de 0.36 N H2SO4. La turbidez se verifica en un espectrofotómetro con haz de luz de 1 cm en la cubeta correspondiente y se controla que la lectura esté entre 0.08 y 0.13 unidades de absorbancia a 625 nm.

c) Siembra en Placas:

La suspensión microbiana preparada en el paso anterior debe utilizarse dentro de los 15 minutos de preparada. El inóculo bacteriano (suspensión bacteriana) obtenido como se indicó en el paso anterior es absorbido con un hisopo. El exceso de líquido se descarta oprimiendo la punta del hisopo contra la pared del tubo. Se inoculara la superficie seca del agar Mueller Hinton por hisopado en tres direcciones para asegurar una completa distribución del inóculo. Se dejan secar las placas entre 3 a 15 minutos antes de proceder a aplicar los discos (no sobrepasar los 15 minutos de inoculada la placa para aplicar los discos).

d) Aplicación de los discos:

Permitir que los discos alcancen la temperatura ambiente antes de abrir los frascos contenedores. Esto se realiza para prevenir la condensación de producto. Mediante el uso de una pinza aplicar los discos sobre la superficie del agar teniendo la precaución de que los discos contacten bien con la superficie del agar, ejerciendo para ello, ligera presión sobre los mismos. **Importante:** aplicar los discos dentro de los 15 minutos de supercaladas las placas y a una distancia apropiada entre ellos para evitar superposición de halos de inhibición del desarrollo microbiano. **Importante:** los discos no deben ser removidos luego que han sido aplicados ya que la difusión inicial de los antimicrobianos es muy rápida.

e) Incubación:

Dentro de los 15 minutos de la aplicación de los discos, las placas deben incubarse invertidas. Consultar en las normas vigentes emitidas por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) la atmósfera y tiempo de incubación según el microorganismo que se quiera recuperar.

f) Proceso de medición:

Para cada disco aplicado medir y registrar el diámetro del halo de inhibición del desarrollo utilizando calibre ó regla calibrada. Consultar las normas vigentes emitidas por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) según el microorganismo que se quiera recuperar. Interpretación de los resultados. Con los resultados obtenidos en el paso anterior interpretar y caracterizar el perfil de sensibilidad del microorganismo según las tablas vigentes emitidas por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

CONTROL DE CALIDAD

Se sugiere realizar el control de calidad a cada lote de discos una vez que se adquiere y también en el tiempo con determinada frecuencia, ya que así se evalúa la calidad de los discos (incluida su conservación), la calidad del medio de cultivo y de la metodología utilizada. Para el control de calidad, realizar la Prueba de Sensibilidad a los Antimicrobianos según la técnica detallada más arriba en este manual, utilizando los microorganismos control de calidad apropiados según el disco a evaluar. Consultar las normas vigentes emitidas por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

LIMITACIONES

- Cualquier desvío de lo descrito en este manual puede producir resultados incorrectos
- Es de fundamental importancia tener en cuenta que este método solamente tiene valor si se respeta una distancia de separación entre los discos, suficiente para limitar las probabilidades de superposición importante de zonas de inhibición. Por consiguiente, se recomienda aplicar hasta 6 discos en una placa convencional de 90 mm (la usada comúnmente en nuestro medio).
- Consultar la bibliografía actualizada para técnica e interpretación de resultados (Normas CLSI, última versión vigente).

MATERIALES NECESARIOS NO PROVISTOS

Equipos y material de laboratorio, microorganismos para control de calidad, reactivos y medios de cultivo adicionales según el requerimiento para realizar la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos por el método de difusión con discos.

PRECAUCIONES

- Producto no clasificado como peligroso.
- Solamente para uso diagnóstico in vitro. Uso profesional exclusivo.
- No utilizar el producto si al recibirlo su envase está abierto o dañado.
- No utilizar el producto si existen signos de contaminación o deterioro, así como tampoco si ha expirado su fecha de vencimiento.
- Utilizar guantes y ropa protectora cuando se manipula el producto.
- Considerar las muestras como potencialmente infecciosas y manipularlas apropiadamente siguiendo las normas de bioseguridad establecidas por el laboratorio.
- Las características del producto pueden alterarse si no se conserva apropiadamente.
- Descartar el producto que no ha sido utilizado y los desechos del mismo según reglamentaciones vigentes.

REFERENCIAS

- Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, M100, versión vigente. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, ex NCCLS).
- Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard January 2018, M02 13th Ed., Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, ex NCCLS).

INDICACIONES AL CONSUMIDOR

Utilizar el producto hasta su fecha de vencimiento. Conservar el producto según las indicaciones del rótulo.

ELABORADO POR: LABORATORIOS BRITANIA S.A.

Director Técnico: Bioq. Alejandro Rossi

SÍMBOLOS UTILIZADOS

