

<b>Britania</b> <sup>▲</sup>	<b>britannialab.com</b>	<span><span><span></span></span><span> </span></span> <span><span><span></span></span><span> </span></span> <span><span><span></span></span><span> </span></span> <span><span><span></span></span><span> </span></span>
------------------------------	-------------------------	---

## Discogramas

<b>REF</b> B1081324	<b>REF</b> B1081024	<b>REF</b> B1081624
<b>REF</b> B1081724	<b>REF</b> B1081524	<b>REF</b> B1081924
<b>REF</b> B1081224	<b>REF</b> B1081124	<b>REF</b> B1081424
<b>IVD</b>		

### USO

Sistema de multidiscos utilizado para la realización de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos.

### FUNDAMENTO

La prueba de sensibilidad a los antimicrobianos por el método de difusión con discos permite categorizar a las bacterias aisladas en un proceso infeccioso como "sensibles, resistentes o de sensibilidad intermedia" a una gran variedad de agentes antimicrobianos.

Para realizar la prueba de sensibilidad con discos o multidiscos de papel de filtro impregnados con una cantidad específica del agente antimicrobiano, los mismos se deben aplicar sobre la superficie de un medio con agar que ha sido inoculado con el microorganismo en estudio. El antimicrobiano contenido en el disco difunde a través del agar y a medida que se aleja del disco su concentración disminuye en forma logarítmica, creándose así un gradiente del antibiótico en el medio con agar alrededor del disco.

Concomitantemente con la difusión del antimicrobiano en el agar, la bacteria que fue inoculada en la superficie del medio de cultivo y no fue inhibida por la concentración del mismo, continúa multiplicándose y formando un crecimiento visible. En las áreas donde la concentración del antimicrobiano es inhibitoria, no hay crecimiento y se desarrolla una zona de inhibición alrededor de cada disco. El tamaño de la zona de inhibición está influenciado por la difusión del agente antimicrobiano a través del agar y varía según el antimicrobiano en cuestión. El tamaño de la zona, sin embargo, es inversamente proporcional a la CIM (Concentración Inhibitoria Mínima).

Los criterios recomendados para interpretar los diámetros de las zonas de inhibición se detallan en las tablas de las pruebas de sensibilidad.

El método estandarizado recomendado por el Subcomité de pruebas de Sensibilidad a los Antimicrobianos del C.L.S.I. (Clinical and Laboratory Standars Institute) se basa en el método originalmente descrito por Kirby – Bauer y cols.

Los sistemas de multidiscos utilizados para las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos se encuentran ampliamente difundidos, constituyendo una herramienta útil para la elección de la terapia antimicrobiana adecuada al paciente.

A fin de asegurar su correcto desempeño, se ha unificado criterio con las autoridades sanitarias en cuanto al número y distribución de discos presentes en los sistemas.

Por tal motivo, presentamos las series de Discogramas Britania, conteniendo cada serie seis antimicrobianos para ser usadas en placas de Petri de 90 mm. La distancia, ha sido establecida en 24 mm de centro a centro respetando una distancia igual o superior a 14 mm entre disco y borde de la placa.

La elección de los antimicrobianos en las distintas series de discogramas, se basa en recomendaciones nacionales e internacionales, tomando como base los estudios de resistencia bacteriana y los antimicrobianos presentes en Argentina.

### CONTENIDO Y COMPOSICIÓN

Todas las series de discogramas se presentan en envases conteniendo 25 unidades y cada unidad contiene 6 antimicrobianos.

Según la serie, los antimicrobianos son los siguientes:

<b>Código B1081324: Serie IU Pediátrica</b>	<b>Código B1081224: Serie IU Adulto</b>
CEF 30 µg Cefalotina 30 µg	NOR 10 µg Norfloxacina 10 µg
GEN 10 µg Gentamicina 10 µg	GEN 10 µg Gentamicina 10 µg
AMS 10/10 µg Ampicilina Sulbactama 10/10 µg	CEF 30 µg Cefalotina 30 µg
TMS 1,25/23,75 µg Trimetoprima Sulfametoxazol 1.25/23.75 µg	NIT 300 µg Nitrofurantoina 300 µg
CTX 30 µg Cefotaxima 30 µg	AMS 10/10 µg Ampicilina Sulbactama 10/10 µg
NIT 300 µg Nitrofurantoina 300 µg	TMS 1.25/23.75 µg Trimetoprima Sulfametoxazol 1.25/23.75 µg

<b>Código B1081024: Serie IU Ambulatoria</b>	<b>Código B1081124: Serie IU Hospitalaria</b>
CIP 5 µg Ciprofloxacina 5 µg	AKN 30 µg Amicacina 30 µg
AMN 10 µg Ampicilina 10 µg	TAZ 100/10 µg Piperacilina Tazobactama 100/10 µg
CEF 30 µg Cefalotina 30 µg	CAZ 30 µg Ceftazidima 30 µg
NIT 300 µg Nitrofurantoina 300 µg	CTX 30 µg Cefotaxima 30 µg
AMS 10/10 µg Ampicilina Sulbactama 10/10 µg	GEN 10 µg Gentamicina 10 µg
TMS 1,25/23,75 µg Trimetoprima Sulfametoxazol 1.25/23.75 µg	OFX 5 µg Ofloxacina 5 µg

<b>Código B1081924: Serie para Coprocultivos</b>	<b>Código B1081624: Serie para Bacilos Gram Negativos BGN1</b>
AMN 10 µg Ampicilina 10 µg	IMP 10 µg Imipenem 10 µg
CIP 5 µg Ciprofloxacina 5 µg	GEN 10 µg Gentamicina 10 µg
TMS 1,25/23,75 µg Trimetoprima Sulfametoxazol 1.25/23.75 µg	CAZ 30 µg Ceftazidima 30 µg
CMP 30 µg Cloranfenicol 30 µg	AMS 10/10 µg Ampicilina Sulbactama 10/10 µg
FUR 100 µg Furazolidona 100 µg	CTX 30 µg Cefotaxima 30 µg
CTX 30 µg Cefotaxima 30 µg	TMS 1.25/23.75 µg Trimetoprima Sulfametoxazol 1.25/23.75 µg

<b>Código B1081724: Serie para Bacilos Gram Negativos BGN2</b>	<b>Código B1081424: Serie para Estafilococos Grupo A</b>
MEM 10 µg Meropenem 10 µg	PEN 10 U Penicilina 10 U
CIP 5 µg Ciprofloxacina 5 µg	OXA 1 µg Oxacilina 1 µg
TAZ 100/10 µg Piperacilina Tazobactama 100/10 µg	ERY 15 µg Eritromicina 15 µg
FEP 30 µg Cefepime 30 µg	CLI 2 µg Clindamicina 2 µg
CEF 30 µg Cefalotina 30 µg	TMS 1.25/23.75 µg Trimetoprima sulfametoxazol 1.25/23.75 µg
AKN 30 µg Amicacina 30 µg	VAN 30 µg Vancomicina 30 µg

<b>Código B1081524: Serie para Estafilococos Grupo B</b>
LEV 5 µg Levofloxacina 5 µg
GEN 10 µg Gentamicina 10 µg
RFA 5 µg Rifampicina 5 µg
MIN 30 µg Minociclina 30 µg
CMP 30 µg Cloranfenicol 30 µg
TEI 30 µg Teicoplanina 30 µg

### INSTRUCCIONES

Producto listo para usar.

### CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO

La carga de antimicrobianos presentes en los discogramas se basa en las recomendaciones de la OMS, en el informe del C.L.S.I. y en trabajos científicos de investigadores argentinos y extranjeros.

### ALMACENAMIENTO

Entre –20 y 0 °C, protegidos de un exceso de humedad.

Nota: la cantidad necesaria para el trabajo semanal o transporte al usuario, puede mantenerse refrigerada a 2 - 8 °C por un tiempo no mayor de siete días.

### PROCEDIMIENTO

Realizar la Prueba de Sensibilidad a los Antimicrobianos según la siguiente técnica (adaptada de Bauer, Kirby y cols):

### 1. Medio de cultivo a utilizar: Mueller Hinton Agar.

Debe controlarse que el pH del mismo se encuentre entre 7.2 y 7.4.

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 25 a 30 ml de Mueller Hinton Agar (el cual se encuentra fundido y enfriado a 50-55°C) en placas estériles, de modo de obtener una capa de 4 mm de espesor. Es fundamental respetar esta condición, pues de lo contrario, se obtendrán halos mayores o menores según el caso.
- Secado de las placas:** para eliminar la humedad sobre la superficie del medio de cultivo, las placas pueden secarse a 33-37 °C durante 10 - 30 minutos.

### 2. Inóculo microbiano:

- Condiciones de los cultivos originales:** es necesario que el antibiograma se realice a partir de cultivos monomicrobianos o cuando menos, con colonias bien separadas del mismo aspecto que se encuentran en la placa de aislamiento. No tiene sentido efectuar antibiogramas con materiales directos que segura o potencialmente contengan flora polimicrobiana (exudados faríngeos, nasales, orina, heces, entre otras).

Importante: tener en cuenta que el método de Bauer y Kirby se aplica a bacilos Gram negativos de fácil desarrollo (por ejemplo Enterobacterias, Pseudomonas entre otros) y a Staphylococcus y Enterococcus, no pudiendo ser utilizado sin modificaciones para determinar la susceptibilidad in vitro frente a otros gérmenes. Las pruebas de difusión por el método de los discos para Haemophilus influenzae, Neisseria gonorrhoeae, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus spp. grupo Beta hemolítico, Streptococcus spp. grupo viridans, se deben realizar de acuerdo a las normas C.L.S.I. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, M100, 27 <sup>TH</sup> ed. , Clinical and Laboratory Standards Institute, Enero 2017. Otras bacterias “fastidiosas” pueden ser ensayadas por el método de dilución.

• **Preparación del inóculo:** tomar 3 a 5 colonias del cultivo original con un ansa estéril y descargarlas en 5 ml de Tripteína Soya Caldo (Britania). Si la suspensión obtenida presenta turbidez similar o superior a la del testigo de turbidez 0.5 de la escala de Mc Farland, no es necesaria una incubación ulterior. De lo contrario, los tubos se incuban a 33-37°C hasta lograrse la turbidez requerida (equivalente al estándar de Mc Farland). En caso que sea necesario diluir para equiparar la suspensión a la del testigo, utilizar Tripteína Soya Caldo o solución fisiológica estéril.

Método de desarrollo previo: puede ser utilizado como método alternativo y en algunas ocasiones es preferido sobre el anterior, por ejemplo frente a bacterias con dificultad para obtener suspensiones homogéneas.

- Aclaración:** el testigo de turbidez 0.5 de la escala de Mc Farland se prepara añadiendo 0.5ml de una solución de BaCl2 0.048 M (1.175% p/v BaCl2 2H2O) a 99.5ml de una solución de H2SO4 0.36 N. Homogeneizar y verificar mediante lectura en espectrofotómetro con un haz de luz de 1 cm y en la cubeta correspondiente que la absorbancia de la solución preparada a 625nm esté dentro del rango 0.08-0.13.

### 3. Siembra en placas:

La suspensión bacteriana obtenida como se indica en el paso anterior es absorbida con un hisopo (no debe usarse ansa ni varilla de vidrio). El exceso de líquido se descarta presionando la punta del hisopo sobre la pared del tubo. Para inocular las placas, aplicar el hisopo sobre la superficie de las mismas, efectuando estrías en tres direcciones diferentes y luego como paso final se hisopa la circunferencia de la placa. Dejar secar aproximadamente cinco minutos antes de proceder a aplicar el discograma elegido.

### 4. Aplicación del discograma:

Mediante el uso de una pinza aplicar el multidisco sobre la superficie del agar. Tener la precaución que las puntas con antimicrobianos contacten bien con la superficie del agar, ejerciendo para ello, ligera presión sobre los mismos. Transcurridos 15 minutos de la colocación del discograma, las placas se incuban invertidas en la estufa a 33 – 37 °C durante toda la noche (18 - 24 horas). Si el microorganismo en ensayo es Staphylococcus o Enterococcus spp., se necesitan 24horas de incubación para vancomicina y oxacilina.

### 5. Medidas de las zonas de inhibición del crecimiento microbiano:

No deben efectuarse lecturas de los antibiogramas basándose en la sola consideración de la presencia o la ausencia del halo de inhibición del desarrollo. En todos los casos se debe tener en cuenta los diámetros de los halos ya que éstos varían según la difusibilidad del antibiótico. Así, un halo pequeño (12 mm) para la colistina (antibiótico poco difusible) representa sensibilidad, en tanto que ese mismo diámetro para el cloranfenicol, indica resistencia. Para medir los halos utilizar calibre o regla calibrada.

**Importante:** Cuando se leen los resultados en cepas que crecen con desarrollo invasor (Proteus mirabilis, Proteus vulgaris), tener la precaución de ignorar el ligero velo de crecimiento invasor, midiendo para ello el halo a partir de donde se detiene el desarrollo confluyente. Algunos antibióticos inhiben el desarrollo invasor y otros no lo hacen.

La presencia de colonias internas en el halo de inhibición del desarrollo en más de un antibiótico con diferente mecanismo de acción (por ejemplo cloranfenicol y gentamicina) generalmente se corresponde con cultivos impuros, consecuentes a fallas en el aislamiento. Si se comprueba que efectivamente se trata de una mezcla, deben efectuarse antibiogramas por separado para cada una de ellas.

Si la presencia de colonias dentro de los halos ocurre alrededor de los discos de un solo antibiótico o de antibióticos muy relacionados (como ser penicilina y ampicilina) ello suele obedecer a la existencia de bacterias previamente resistentes en la población usada como inóculo. La prudencia aconseja interpretar tales casos como resistencia y sugerir la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) o de la concentración bactericida mínima (CBM) para el caso en que se desee administrar el antibiótico en cuestión.

### 6. Interpretación de los resultados

Determinados los diámetros para cada antimicrobiano ensayado, puede concluirse que el germen es sensible, de sensibilidad intermedia o resistente, de acuerdo a las tablas publicadas por C.L.S.I. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, M100, 27 <sup>TH</sup> ed. , Clinical and Laboratory Standards Institute, Enero 2017. Para los antibióticos introducidos luego de la aparición de la publicación mencionada, deben consultarse trabajos en los que se haya respetado la metodología de los autores y en los que se efectuaron determinaciones de la concentración inhibitoria mínima y se hayan establecido convenientemente las curvas de regresión.

**Importante:** La categoría intermedia debe ser informada. Las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) para estos casos, se aproximan a las que se obtienen en niveles sanguíneos y tisulares y las respuestas pueden ser bajas para las cepas aisladas. La categoría intermedia implica aplicación clínica en sitios donde los antimicrobianos se concentran (por ejemplo quinolonas y betalactámicos en orina) o cuando se pueden usar altas concentraciones del antibiótico (por ejemplo betalactámicos). La categoría intermedia también indica una zona buffer o reguladora, que suele prevenir algunos factores técnicos de descontrol que causarían discrepancias en la interpretación, especialmente cuando los antimicrobianos tienen un estrecho margen de farmacotoxicidad.

### NOTAS GENERALES

- Las zonas de inhibición obtenidas con aminoglucósidos, particularmente cuando se ensaya Pseudomonas aeruginosa dependen del contenido de cationes divalentes del medio de cultivo. Estos estándares de interpretación sólo deben ser usados con Mueller Hinton Agar cuya eficacia haya sido aprobada previamente con la cepa control de Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853. Los microorganismos que entran en la categoría de sensibilidad intermedia, pueden ser sensibles o resistentes cuando se ensayan por métodos de dilución y deberán ser clasificados por lo tanto, como de sensibilidad "indeterminada".
- El disco de Ampicilina 10 ug representa además a Amoxicilina.
- La sensibilidad y resistencia a Azitromicina y Claritromicina puede predecirse ensayando el disco de Eritromicina 15 ug.
- El disco de 30 ug de Cefazolina no es adecuado para predecir la sensibilidad de otras cefalosporinas de 1º generación. El disco representativo es el de Cefalotina 30 ug en donde los criterios de interpretación para Cefalotina 30 ug solo pueden ser aplicados a los agentes orales como Cefradina, Cefadroxilo, Cefpodoxima y Cefalexina. Datos antiguos que sugieren que los resultados de Cefalotina pueden predecir resultados a algunas otras cefalosporinas pueden ser correctos pero no tienen confirmación reciente.
- El disco de Cefotaxima 30 ug, representa al grupo de antimicrobianos conocidos como aminotiazolmetoximinocefalosporinas y si bien el disco contiene la de primera aparición en el mercado, de ninguna manera debe suponerse que implica preferencia por este antimicrobiano y el informe al médico debe indicar el mismo resultado para Cefotaxima, Ceftizoxima y Ceftriaxona. Estos antimicrobianos son poco efectivos frente a Pseudomonas aeruginosa y a diferencia

de lo que ocurre con Enterobacterias, las CBM suelen ser superiores a la CIM, por lo que se sugiere consignar como sensibles, aquellas cepas que estén dentro del rango de sensibilidad. La actividad in vitro de Cefotaxima, Ceftizoxima y Ceftriaxona son análogas; las diferencias en la CIM son mínimas o inexistentes y cuando se presentan no suelen superar el valor de una dilución, por ende los diámetros de los halos de inhibición por el método de los discos son superponibles. Tales antibióticos difieren únicamente en sus propiedades farmacocinéticas.

- Ceftacídima es una carboxipropiloximinocefalosporina y presenta frente a enterobacterias, la misma actividad que los aminotiazolmetoximinocefalosporinas; sin embargo es considerablemente más activa frente a Pseudomonas aeruginosa.
- Cefixima tiene una actividad semejante, pero no igual a cefotaxima y tiene la ventaja de su administración oral.
- La Colistina y la Polimixina B difunden poco en el agar, por lo que la precisión del método de difusión es menor que en el caso de otros antibióticos. En los casos necesarios, conviene confirmar los resultados de la prueba de difusión por un método de dilución (CIM).
- El disco de Clindamicina 2 ug se usa para evaluar sensibilidad a Clindamicina y Lincomicina.
- Los discos de Fosfomicina 200 ug tienen incluido 50 ug de glucosa 6-fosfato.
- Los datos de la prueba de sensibilidad para Ácido Nalidíxico, Nitrofurantoina, Norfloxacina y Sulfonamidas se aplican solamente a microorganismos aislados de infecciones urinarias.
- Los resultados con el disco de Oxacilina 1 ug pueden extenderse a Meticilina, Cloxacilina, Dicloxacilina y Flucloxacilina. En el caso de los estafilococos, cuando se obtiene un resultado en la categoría de “intermedio”, estas cepas deben ser investigadas para detectar si existe heterorresistencia, por ejemplo utilizando discos de Cefoxitina 30 µg por método de difusión.
- De las ureidopenicilinas presentes en Argentina, Piperacilina es la de mayor actividad. Este tipo de antimicrobiano sufre un considerable “efecto inóculo”, o sea que si se aumenta la concentración del inóculo, aumenta en forma desproporcionada la CIM, la que se traduce en halos dentro del rango de resistencia, o ausencia de halos en cepas previamente sensibles. Este efecto se atribuye a la inestabilidad del antibiótico frente a altas concentraciones de betalactamasas.
- El disco de Sulfisoxazol puede ser usado para predecir la sensibilidad de cualquiera de las sulfonamidas disponibles comercialmente. Los medios que contienen sangre, excepto los que contienen sangre de caballo lisada, no son adecuados para ensayar sulfonamidas. El Mueller Hinton Agar debe estar libre de timidina para evaluar sulfonamidas y/o trimetoprima.
- La efectividad del Mueller Hinton Agar para el ensayo de TMS se controla con la cepa de Enterococcus faecalis ATCC 29212. El halo de inhibición del desarrollo microbiano mayor a 20 mm libre de pequeñas colonias, indica niveles bajos o nulos de timina y timidina.
- Tetraciclina es la clase de disco para todas las tetraciclinas y los resultados pueden ser aplicados a Clortetraciclina, Doxiciclina, Minociclina y Oxitetraciclina. Sin embargo algunas cepas de estafilococos y Acinetobacter spp. son más sensibles a Doxiciclina y Minociclina y sus resultados no pueden trasladarse a Tetraciclina con sensibilidad en la categoría intermedia o resistente.
- Los discos de Rifampicina 5 ug permiten evaluar la sensibilidad de los estafilococos a este antibiótico. La rifampicina se usa combinada con otro antimicrobiano en el tratamiento.

