

COLTEST BRITANIA

REF B2327131

USO

Medio de cultivo diferencial que permite evaluar cualitativamente la sensibilidad a colistina en bacilos Gram negativos.

FUNDAMENTO

COLTEST BRITANIA es una prueba de sensibilidad a colistina basada en la dilución en agar, utilizando una única concentración de colistina conocida como "punto de ruptura", según lineamientos del Clinical Laboratory Standard Institute –CLSI– (3). Brevemente, de acuerdo a lineamientos del CLSI (3), para las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos pueden utilizarse métodos de dilución en caldo o agar (ej., COLTEST BRITANIA) para medir cuantitativamente la actividad in vitro de un agente antimicrobiano contra un aislado bacteriano dado. Para realizar dichas pruebas, según este estándar (3), se prepara una serie de tubos o placas con un caldo o medio de agar Mueller-Hinton, respectivamente, al que se añaden diversas concentraciones de los agentes antimicrobianos. Los tubos o placas se inoculan a continuación con una suspensión estandarizada del organismo de ensayo. Después de la incubación a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, se examinan los ensayos y se determina la concentración inhibitoria mínima (CIM). La CIM se ha determinado históricamente utilizando concentraciones derivadas tradicionalmente de diluciones en serie dos, indexadas a la base logarítmica de 2 (por ejemplo, 1, 2, 4, 8, 16 $\mu\text{g/mL}$). Según la normativa del CLSI (3), el número de concentraciones ensayadas es decisión del laboratorio. En sus lineamientos establece que pueden utilizarse otros esquemas de dilución, incluyendo el uso de una concentración o "punto de ruptura", siempre que dicha concentración abarque los puntos de corte interpretativos (o las categorías definidas por ellos) proporcionados en los documentos suplementarios M100 (4) para el antimicrobiano ensayado y que permita que al menos un organismo de control de calidad presente valores en escala de la concentración seleccionada. Los puntos de corte de colistina vigentes, según la normativa del CLSI (4), coincidentes con los del European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing –EUCAST– (5) de aplicación para Enterobacterales, *Pseudomonas aeruginosa* (CLSI) o *Pseudomonas* spp. (EUCAST) y *Acinetobacter baumannii* (CLSI) o *Acinetobacter* spp. (EUCAST) son:

- sensible menor o igual a 2.0 $\mu\text{g/mL}$
- resistente mayor o igual a 4.0 $\mu\text{g/mL}$

COLTEST BRITANIA utiliza una única concentración de colistina en el "punto de ruptura" (o sea, 3.0 $\mu\text{g/mL}$), entre las dos diluciones en serie dos, indexadas a la base logarítmica de 2 (es decir, 2.0 $\mu\text{g/mL}$ y 4.0 $\mu\text{g/mL}$), que definen las dos categorías de interpretación posibles, de sensible y resistente, respectivamente. Un aislado bacteriano dado con una CIM de colistina dentro de la categoría de sensible (es decir, CIM menor o igual a 2.0 $\mu\text{g/mL}$) no presentará desarrollo o desarrollará 1 colonia en una placa de Mueller-Hinton Agar con el añadido de una concentración de colistina equivalente a los 3.0 $\mu\text{g/mL}$ (COLTEST BRITANIA). Un aislado bacteriano dado con una CIM de colistina dentro de la categoría de resistente (es decir, CIM mayor o igual a 4.0 $\mu\text{g/mL}$) presentará desarrollo de 2 o más colonias en la placa de Mueller-Hinton Agar con el añadido de una concentración de colistina equivalente a los 3.0 $\mu\text{g/mL}$ (COLTEST BRITANIA). Los inóculos pueden aplicarse a las superficies de agar utilizando un aparato de replicación de inóculos capaz de transferir múltiples inóculos a cada placa o de manera manual, según se proceda.

El método de dilución en agar para determinar la susceptibilidad antimicrobiana es una técnica bien establecida (6). Recientemente, ha sido sugerido que la dilución de agar podría evitar el problema de "pegado" de moléculas policatiónicas como colistina a materiales poliestirénicos como los que componen las microplacas utilizadas en la técnica de referencia de microdilución, por lo tanto, proveerá información más confiable de la sensibilidad a colistina de un aislado bacteriano, en especial para resistencias de bajo nivel (7). En concordancia, algunos estudios sugieren que la dilución en agar podría detectar más fácilmente la resistencia a la colistina en *P. aeruginosa* (8, 9), aunque es aún tema de debate ya que otros estudios sólo han demostrado equivalencia entre la dilución en agar y la microdilución en caldo (10-12).

CONTENIDO Y COMPOSICIÓN:

REF B2327131: COLTEST BRITANIA: 1 envase por 10 placas

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 en discos.

INSTRUCCIONES

Producto listo para usar
Almacenamiento entre 2° y 8°C .

PROCEDIMIENTO

Previo al uso eliminar la humedad que pudiera existir en la superficie del medio de cultivo, ya sea mediante secado a $33-37^\circ\text{C}$ o bajo flujo laminar durante 10 - 30 minutos.

Muestra:

El ensayo se realiza a partir de cultivos monomicrobianos frescos de las cepas en estudio.

Las cepas a partir de las cuales se realiza el test deben estar como cultivos puros en placas de Sangre Agar, de CLDE Medio, de Mueller-Hinton Agar, de Agar cromogénico, o de Agar Chocolate con 18 a 24 horas de incubación.

Inoculación:

A partir de cada aislamiento bacteriano, asepticamente con ansa o hisopo estéril tomar entre 3 a 5 colonias y resuspenderlas en un tubo que contiene entre 3 a 5 ml de solución fisiológica estéril hasta lograr una turbidez a la equivalente del tubo 0.5 de la escala de Mc Farland. Mediante el uso de hisopo estéril, absorber la suspensión bacteriana y eliminar el exceso de líquido oprimiendo la punta del hisopo contra la pared del tubo por arriba del mérfido del líquido.

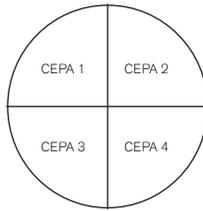
Depositar directamente el contenido del hisopo en la superficie del COLTEST BRITANIA, abarcando una superficie del agar de aproximadamente 1.5 – 2.0 cm de largo por igual ancho (área aprox. de 2 cm^2). Hisopar el área mencionada en una sola dirección una única vez. Una vez inoculadas las placas, dejarlas secar entre 3 a 5 minutos para absorber el líquido.

Notas:

- La interpretación de resultados es apropiada cuando cada cepa se inocula abarcando una superficie de agar descripta e hisopando el microorganismo en una sola dirección una única vez (evitando superponer el inóculo). Distribuir el inóculo bacteriano en una superficie menor podría evitar la completa descarga del inóculo embebido en el hisopo, pudiendo producir un resultado falso sensible. Hisopar una superficie mayor, no se traduciría en un cambio de la interpretación de la categoría de un aislado

bacteriano evaluado, pero podría dispersar las unidades formadoras de colonias, generando involuntariamente un crecimiento semi-confluyente. Un crecimiento semi-confluyente se presenta naturalmente en cepas con resistencia de naturaleza heterogénea, donde el rasgo resistente no es expresado por toda la población bacteriana. Si bien a los fines clínicos en estos aislados hetero-resistentes se debe evitar el uso de colistina (23), presentando por ende el mismo manejo terapéutico que aquellos homo-resistentes, este fenotipo suele asociarse a aislados bacterianos con exposición previa a la colistina o son rasgos propios de algunas especies bacterianas, como *Salmonella* spp. Esta información puede resultar muy útil para el control de infecciones ya que la recuperación de una cepa con resistencia heterogénea a colistina de un paciente sin exposición previa a este antibiótico podría sugerir una vía de adquisición desde otro paciente previamente tratado con colistina. Por ese motivo, se debe evitar hisopar superficies mayores a las sugeridas a fin de no generar de manera artificial un crecimiento semi-confluyente.

- Una misma placa permite inocular hasta 4 cepas simultáneamente, teniendo la precaución que el medio de cultivo esté seco, la inoculación de cada cepa sea prolija y sin salpicaduras para evitar la contaminación cruzada entre cepas. Véase el siguiente esquema:



Incubación: las placas se incuban en aerobiosis, a $33-37^\circ\text{C}$, durante 18-24 horas.

Importante: si se observa desarrollo microbiano previo a las 24 hs, podrá reportarse el aislado como resistente a colistina. En cambio, si no se observa desarrollo microbiano previo a las 24 horas, dejar incubando las placas hasta 24 horas para efectuar la lectura y reporte de resultados. Véase la sección **Limitaciones**.

Lectura de resultados:

Se observa el desarrollo microbiano con luz incidente, a ojo desnudo.

Interpretación de los resultados:

Enterobacterales y Acinetobacter spp.:

- Crecimiento negativo: sin desarrollo bacteriano o desarrollo de 1 colonia en COLTEST BRITANIA: Interpretación: Sensibilidad a colistina.
- Crecimiento positivo: desarrollo de 2 o más colonias en COLTEST BRITANIA: Interpretación: Resistente a colistina.

Pseudomonas spp.:

- Crecimiento negativo: sin desarrollo bacteriano o desarrollo de 1 colonia en COLTEST BRITANIA: Interpretación: Sensibilidad a colistina.
- Crecimiento positivo: desarrollo de 2 o más colonias en COLTEST BRITANIA: Interpretación: confirmar el aislamiento con un método de dilución para determinar el valor real de CIM en caldo y así poder categorizar el aislamiento como sensible o resistente.

CONTROL DE CALIDAD

Se sugiere realizar el control de calidad a cada lote de COLTEST BRITANIA una vez que se adquiere y también en el tiempo con determinada frecuencia, ya que así se evalúa la calidad de las placas (incluida su conservación) y la metodología utilizada. Emplear las cepas para control de calidad detalladas a continuación, junto con los resultados esperados. Estas cepas para control de calidad forman parte de la colección de cepas del American Type Culture Collection (ATCC) y del Servicio de Antimicrobianos del Instituto Malbrán.

Microorganismo	Colección	CIM colistina (microdilución)	PCR gen mcr	Resultado en COLTEST
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	0.5 – 2.0 $\mu\text{g/mL}^4$	Negativo	Sin desarrollo bacteriano o 1 colonia
<i>Escherichia coli</i>	Malbrán NI 19736	8 $\mu\text{g/mL}^{15}$	Positivo	Desarrollo bacteriano (2 o más colonias)

Malbrán NI: identificación de la cepa en el Servicio de Antimicrobianos del Instituto Malbrán.

LIMITACIONES

-Es de fundamental importancia tener en cuenta que este método solamente tiene valor si se respeta el tamaño del inóculo utilizado (en escala 0,5 de Mc Farland), hisopando el microorganismo en una sola dirección una única vez, y se siembra hasta la cantidad recomendada de 4 (cuatro) aislados bacterianos a fin de evitar salpicaduras y contaminación cruzada entre cepas.

-Una vez incubada, la placa debe ser descartada, no se puede reutilizar ya que la re-incubación podría reducir la concentración de colistina en la placa.

-El desarrollo microbiano puede ser colonias aisladas puntiformes o de mayor tamaño, crecimiento en forma de pátina o crecimiento masivo.

-Si bien la lectura de resultados puede ser entre 18 a 24 horas de incubación, todo informe de resultados "sensible a la colistina" debe corresponder a la lectura realizada a las 24 horas de incubación y no previamente. No informar resultados sensibles a colistina a tiempos de incubación menores de 24 horas.

-El crecimiento de una sola colonia en COLTEST BRITANIA puede ocurrir con cierta regularidad en cepas salvajes (sin resistencia adquirida a la colistina pre-existente) debido a una emergencia "de novo" al exponer la cepa a la colistina, y no a una pérdida o heterogeneidad de la concentración de colistina de la placa. La causa principal es por trabajar con inóculos microbianos en el límite superior del rango o con franco exceso de tamaño. Debido a esto, el criterio de interpretación sensible a colistina es el desarrollo de hasta 1 colonia microbiana.

-Para las cepas de *Pseudomonas* spp. se modificó el punto de corte (EUCAST 2022), siendo sensible menor o igual a 4 $\mu\text{g/mL}$ y resistente mayor a 4 $\mu\text{g/mL}$. Debido a esto, para todo crecimiento microbiano de 2 o más colonias es necesario realizar CIM para poder categorizar el aislamiento como sensible o resistente.

NOTA: Si la CIM se hace por microdilución en caldo, el alcance es para

todas las especies de *Pseudomonas* spp. Si en cambio se utiliza el protocolo de elución de discos de CLSI (Tabla 3D, CLSI 2022) o el equivalente modificado por LNR (<http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2017/09/Protocolo-Met-de-Elución-de-Discos-de-COL-versión3-Nov2017.pdf>), sólo aplica a *P. aeruginosa*.

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. Las placas no deben presentar rajaduras, el medio de cultivo no debe presentar grietas o estrías.
- 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.
- El medio de cultivo en las mismas debe ser ámbar claro, ligeramente opalescente, de aspecto homogéneo y espesor uniforme.
- Considerar las muestras como potencialmente infecciosas y manipular las 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

- 1- EUCAST Clinical Breakpoints - bacteria (v 12.0), 2022, https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
- 2- Comité de infectología crítica, Sociedad Argentina de Terapia Intensiva. Guías para el control de infecciones por enterobacterias resistentes a carbapenemes o productoras de carbapenemasas <http://www.sati.org.ar/files/infectologia/2010-kpc-enterobacterias-productoras-carbapenemasas-guias-adaptadas-del-cdc-hicpac.pdf>, 2010.
- 3- Consenso SADI-SATI-INE-ADECI. Guía para el manejo racional de la antibiototerapia en la Unidad de Terapia Intensiva. Rev Panam Infectol 2008;10(3):48-64. http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/renacip/api_2008_consenso_atb_en_uti.pdf
- 4- Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—M07-A10, Tenth Edition, 2015. Clinical Laboratory Standard Institute, Wayne, PA, USA
- 5- Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 27th Edition, 2017. . Clinical Laboratory Standard Institute, Wayne, PA, USA
- 6- Actualización del criterio de interpretación de "Colistina Agar Spot marca Britania en aislamientos de Enterobacterales, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp.". Servicio Antimicrobianos, Laboratorio Nacional de Referencia en Antimicrobianos, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS "Dr Carlos G malbrán", 2022.
- 7- Breakpoints Tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 7.0, valid from 01-01-2017. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Ed. 2017
- 8- Patel JB, Tenover FC, Turnidge JD, Jorgensen JH. Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, eds. Manual of Clinical Microbiology. 10th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2011:1122-1143
- 9- Humphries R. Susceptibility Testing of the Polymyxins: Where Are We Now? Review of therapeutics. 2015 Jan;35(1):22-7. doi: 10.1002/phar.1505
- 10- Hogardt M, Schmoldt S, Gotzfried M, Adler K, Heesemann J. Pitfalls of polymyxin antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients. J Antimicrob Chemother 2004;54:1057-61.
- 11- Moskowitz SM, Garber E, Chen Y, et al. Colistin susceptibility testing: evaluation of reliability for cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*. J Antimicrob Chemother 2010;65:1416-23.
- 12- Hindler JA, Humphries RM. Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant Gram-negative bacilli. J Clin Microbiol 2013;51:1678-84
- 13- Lo-Ten-Foe JR, de Smet AM, Diederer BM, Kluytmans JA, Van Keulen PH. Comparative evaluation of the VITEK 2, disk diffusion, etest, broth microdilution, and agar dilution susceptibility testing methods for colistin in clinical isolates, including heteroresistant *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* strains. Antimicrob Agents Chemother 2007;51: 3726-30.
- 14- Gales AC, Reis AO, Jones RN. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. J Clin Microbiol 2001;39: 183-90.
- 15- Methods for the Identification of Cultured Microorganisms Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, M58-Ed1. Clinical Laboratory Standard Institute, Wayne, PA, USA, 2017.
- 16- Liu, YY, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis 2016. Volume 16 , Issue 2 , 161 - 168 . [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)
- 17- Rapoport M, Faccone D, Pasteran F, Ceriana P, Alborno E, Petroni A; MCR Group, Corso A. First Description of mcr-1-Mediated Colistin Resistance in Human Infections Caused by *Escherichia coli* in Latin America. Antimicrob Agents Chemother. 2016 Jun 20;60(7):4412-3. doi: 10.1128/AAC.00573-16
- 18- Tjiet N, Faccone D, Rapoport M, Seah C, Pasterán F, Ceriana P, Alborno E, Corso A, Petroni A, Melano RG. Molecular characteristics of mcr-1-carrying plasmids and new mcr-1 variant recovered from polyclonal clinical *Escherichia coli* from Argentina and Canada. PLoS One. 2017 Jul 5;12(7):e0180347. doi: 10.1371/journal.pone.0180347.
- 19- Dominguez JE, Figueroa Espinosa RA, Redondo LM, Cejas D, Gutkind GO, Chacana PA, Di Conza JA, Fernández-Miyakawa ME. Plasmid-mediated colistin resistance in *Escherichia coli* recovered from healthy poultry. Rev Argent Microbiol. 2017 Jul - Sep;49(3):297-298. doi: 10.1016/j.ram.2017.02.001
- 20- Chew KL, La MV, Lin RTP, Teo JWP. 2017. Colistin and polymyxin B susceptibility testing for carbapenem-resistant and mcr -positive Enterobacteriaceae : Comparison of Sensititre, Microscan, Vitek 2, and Etest with broth microdilution. J Clin Microbiol. 2017. doi:10.1128/JCM.00268-17
- 21- Vasoo S. Susceptibility testing for the polymyxins: Two steps back, three steps forward? J Clin Microbiol. 2017 doi:10.1128/JCM.00888-17
- 22- ISO-20776. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems - Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices - Part 2: Evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. International Organization for Standardization. 2007.
- 23- U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Devices and Radiological Health. Guidance for Industry and FDA. Class II Special Controls Guidance Document: Antimicrobial Susceptibility Test (AST) Systems, August 28, 2009.

24- Informe VALIDACION COLTEST BRITANIA. Servicio Antimicrobianos, Laboratorio Nacional de Referencia en Antimicrobianos, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS "Dr. C. Malbrán". 18 de agosto de 2017

25- El-Halfawy OM, Valvano MA. Antimicrobial heteroresistance: an emerging field in need of clarity. Clin Microbiol Rev. 2015 Jan;28(1):191-207. doi: 10.1128/CMR.00058-14.

INDICACIONES AL CONSUMIDOR

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

AUTORIZACIÓN ANMAT

PM-1292-13
Dir. Técnico: Bioq. Alejandro Rossi

SÍMBOLOS UTILIZADOS

 DIAGNÓSTICO IN VITRO	 CÓDIGO N°	 ELABORADOR
 FECHA DE VENCIMIENTO	 N° DE DETERMINACIONES	 LOTE N°
 LÍMITE DE TEMPERATURA	 INSTRUCCIONES DE USO	 ESTÉRIL