

## **DOCUMENTO TÉCNICO**

**Instructivo para la realización del método de  
elución de disco para determinar la resistencia a  
colistina**

**DIRECCIÓN REDES EN SALUD PÚBLICA**

**SUBDIRECCIÓN LABORATORIO NACIONAL  
DE REFERENCIA**

**GRUPO DE MICROBIOLOGÍA**

**2019**

1 de 6

**Dirección**

Martha Lucia Ospina Martínez  
Directora General Instituto Nacional de Salud

**Coordinación**

Astrid Carolina Flórez Sánchez  
Director Técnico Redes en Salud Pública (E)

Esther Cristina Barros Liñan  
Subdirector Laboratorio Nacional de Referencia  
Dirección de Redes en Salud Pública (E)

Carolina Duarte Valderrama  
Coordinadora Grupo de Microbiología  
Laboratorio Nacional de Referencia  
Dirección de Redes en Salud Pública

**Elaborado por**

María Victoria Ovalle  
Grupo de Microbiología  
Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia (SLNR)  
Dirección Redes en Salud Pública

## Instructivo para la realización del método de elución de disco para determinar la resistencia a colistina

### 1. Introducción

En los últimos años, la colistina (polimixina E) ha ganado importancia al ser considerado el tratamiento de elección para infecciones causadas por bacterias Gram negativas multirresistentes. Se ha sugerido que la fuente probable de la resistencia a colistina sería el consumo intensivo de polimixinas en la crianza de animales para la producción de alimentos (1). En 2012, la Organización Mundial de la Salud (OMS) hace un llamado al uso prudente de colistina.

De acuerdo con los resultados obtenidos a partir de la vigilancia nacional por el laboratorio, el Instituto Nacional de Salud y el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos detectaron la circulación de aislamientos resistentes a colistina portadores del gen *mcr1* procedentes de humanos y alimentos (2,3)

La problemática se incrementa debido a que los paneles de susceptibilidad antimicrobiana utilizados en los diferentes equipos automatizados disponibles en el país presentan resultados de falsa sensibilidad a la colistina, lo cual dificulta las opciones terapéuticas y el tratamiento dependerá del criterio clínico.

Por lo anterior, el INS validó una metodología alterna conocida como el método de elución de disco, con el objetivo de ser utilizado como método alternativo para determinar la resistencia a colistina en las instituciones de salud.

### 2. Metodología

Adaptación del método de elución de discos de colistín servicio antimicrobianos, laboratorio nacional de referencia en antimicrobianos, INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán. <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2017/09/Protocolo-Met-de-Eluci%C3%B3n-de-Discos-de-COL-version3-Nov2017.pdf>

### 3. Consideraciones generales

El objetivo de este método es medir la actividad in vitro de colistina (COL) frente a un aislamiento bacteriano. Se fundamenta en agregar discos de COL a tubos con caldo Mueller Hinton ajustado en cationes para obtener concentraciones de COL de 1, 2 y 4 µg/ml. Luego de la inoculación de estos con un inóculo bacteriano estándar, se incuban de 18 – 24 horas y se determina la concentración inhibitoria mínima como la menor concentración de COL que inhibe el crecimiento bacteriano.

### 4. Reactivos e insumos

1. Solución salina (SS) (0.9% NaCl).
2. Caldo Mueller Hinton ajustado en cationes (tubos de vidrio con 1 ml).
3. Discos de COL 10 µg.

4. 0.5 McFarland estándar de turbidez.
5. Incubadora ( $35 \pm 2^\circ\text{C}$ ).
6. Micropipeta graduable
7. Puntas estériles.
8. Asa calibrada de 10  $\mu\text{l}$ .

## 5. Control de calidad

Cepa de control de calidad: cepa OPS 229 CIM COL esperada:  $\geq 4 \mu\text{g/ml}$  o en su defecto cualquier aislamiento que previamente haya reportado una CIM a COL  $\geq 4 \mu\text{g/ml}$  por el método de referencia y un control negativo (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, CIM COL: 0.5 – 4  $\mu\text{g/ml}$  o *Escherichia coli* ATCC 25922 CIM COL: 0.25 – 2  $\mu\text{g/ml}$ ).

## 6. Micrométodo (adaptación del LNR)

### A. Preparación de los tubos con COL (volumen final 1ml):

1. Rotular 4 tubos de vidrio para cada aislamiento como 1, 2, 4  $\mu\text{g/ml}$  y control. Colocar 10 ml de Caldo Mueller Hinton ajustado en cationes en cada tubo.
2. Agregar en forma aséptica 1 disco de COL al tubo rotulado como “1”, 2 discos al tubo “2” y 4 discos al tubo “4”  $\mu\text{g/ml}$ .
3. Permitir la elución de los discos de COL por lo menos media hora a temperatura ambiente.
4. Homogeneizar con una pipeta el contenido del tubo rotulado como “1” y fraccionarlo en diez tubos de vidrio con tapa a rosca (o similar que permita el almacenamiento) dispensando 1ml de la solución en cada tubo. Rotular como “1” a cada uno de los diez tubos fraccionados. Proceder de la misma manera con los tubos “2”, “4” y “control”.

**NOTA:** Si decide almacenar los tubos con elución de colistina, deberá conservarlos a  $-20^\circ\text{C}$ , bien cerrados para evitar la evaporación. En el momento de su uso deberá retirarlos del congelador y esperar a que tomen su temperatura ambiente

### B. Procedimiento:

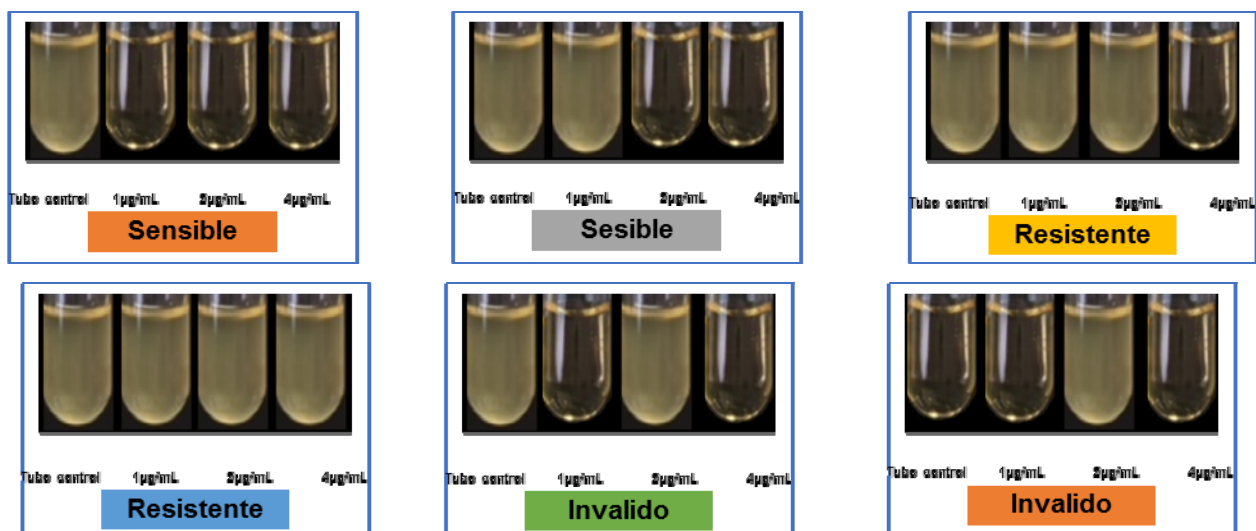
1. A partir de una caja de petri de medio nutritivo (Agar sangre, Agar BHI, Agar nutritivo) con crecimiento de 18 a 24 horas preparar un inóculo del aislamiento en SS con una turbidez equivalente al 0.5 McFarland (aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml).
2. Agregar 5  $\mu\text{l}$  del inóculo a cada uno de los cuatro tubos (1, 2, 4 y control) (concentración final  $7.5 \times 10^5$  CFU/ml, aproximadamente).
3. Mezclar cada tubo suavemente con vortex (para evitar la pérdida de COL por adhesión a la superficie de vidrio sobre el menisco o a la tapa) e incubar a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  para Enterobacterias de 16-20 horas, para *Acinetobacter* spp., 24 horas y para *P. aeruginosa* 18 horas.

### C. Lectura e interpretación (Ver figura 1):

1. Examinar el tubo control: se debe observar turbidez para validar la prueba.
2. Leer la CIM como la menor concentración en la que no se observa turbidez.

3. Interpretar el resultado como: SENSIBLE a COL si la CIM es  $\leq 2 \mu\text{g/mL}$  (tubos 1 ó 2) o RESISTENTE si la CIM es  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$  (tubo 4).
4. Se considera un resultado inválido cuando se observa crecimiento en tubos salteados o cuando el tubo control no presenta crecimiento.

**FIGURA 1. Lectura e Interpretación**



## 7. Aclaraciones

- Si se obtiene crecimiento en tubos salteados (ejemplos: crecimiento solo en el tubo 2, crecimiento en el tubo 1 y 4, o crecimiento solo en el tubo 4), se debe repetir la prueba. Esto podría deberse a:
  - Contaminación en la dilución mayor.
  - Inadecuada inoculación de los tubos.
  - Aislamientos heteroresistentes.
  - Concentración inadecuada de COL en los tubos.
- Revisar el crecimiento de cada tubo, si se observa algún patrón de crecimiento inesperado, confirmarlo realizando un control de pureza del tubo sospechoso.
- Se debe utilizar como cepa de control de calidad un aislamiento con resistencia a colistina confirmada (control positivo) y como control negativo la ATCC de *P. aeruginosa* 27853 ó *E. coli* ATCC 25922
- Como control de calidad del micrométodo se sugiere ensayar un control positivo y negativo cada vez que se prepara un lote de diez determinaciones. Realizar control de calidad con las cepas ATCC si se utilizan lotes de colistina de diferentes fabricantes.

**NOTA:** Este método es una estandarización realizada por el Grupo de Microbiología de la Dirección Redes en Salud Pública del Instituto Nacional de Salud (INS), de la técnica estandarizada en el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbran, Laboratorio Regional de Referencia para Colombia, por lo tanto, el Grupo de Microbiología del INS, no se responsabiliza de cualquier modificación realizada al método y cada usuario podrá realizar los ajustes de acuerdo a las condiciones propias de su laboratorio.

## 8. Bibliografía

1. Boletín de la Organización Mundial de la Salud 2016;94:638-639. doi: <http://dx.doi.org/10.2471/BLT.16.020916>. Disponible en: <https://www.who.int/bulletin/volumes/94/9/16-020916.pdf>
2. Alerta por la primera detección de mcr-1 gen de resistencia a colistina en aislamientos de *Salmonella entérica serovar* Typhimurium y *Escherichia coli* de origen humano en Colombia”. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/tramites-y-servicios/examenes-de-inter%C3%A9s-en-salud-publica/Microbiologa/Gen%20mcr-1%20en%20Ecoli%20%20y%20Salonella.pdf>
3. Alerta por la primera detección del gen mcr-1 de resistencia al antibiótico colistina en aislamientos de *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Give en alimentos en Colombia. Oficina de laboratorios y control de calidad – Laboratorio de microbiología de alimentos INVIMA. Disponible en <https://www.invima.gov.co/alimentos-y-bebidas-aler-sani/02-08-17-alerta-colistina-alimentos-pdf/detail.html>