



EUCAST

EUROPEAN COMMITTEE
ON ANTIMICROBIAL
SUSCEPTIBILITY TESTING

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

EUCAST: método de difusión con discos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos

Versión 1.1
Junio de 2010

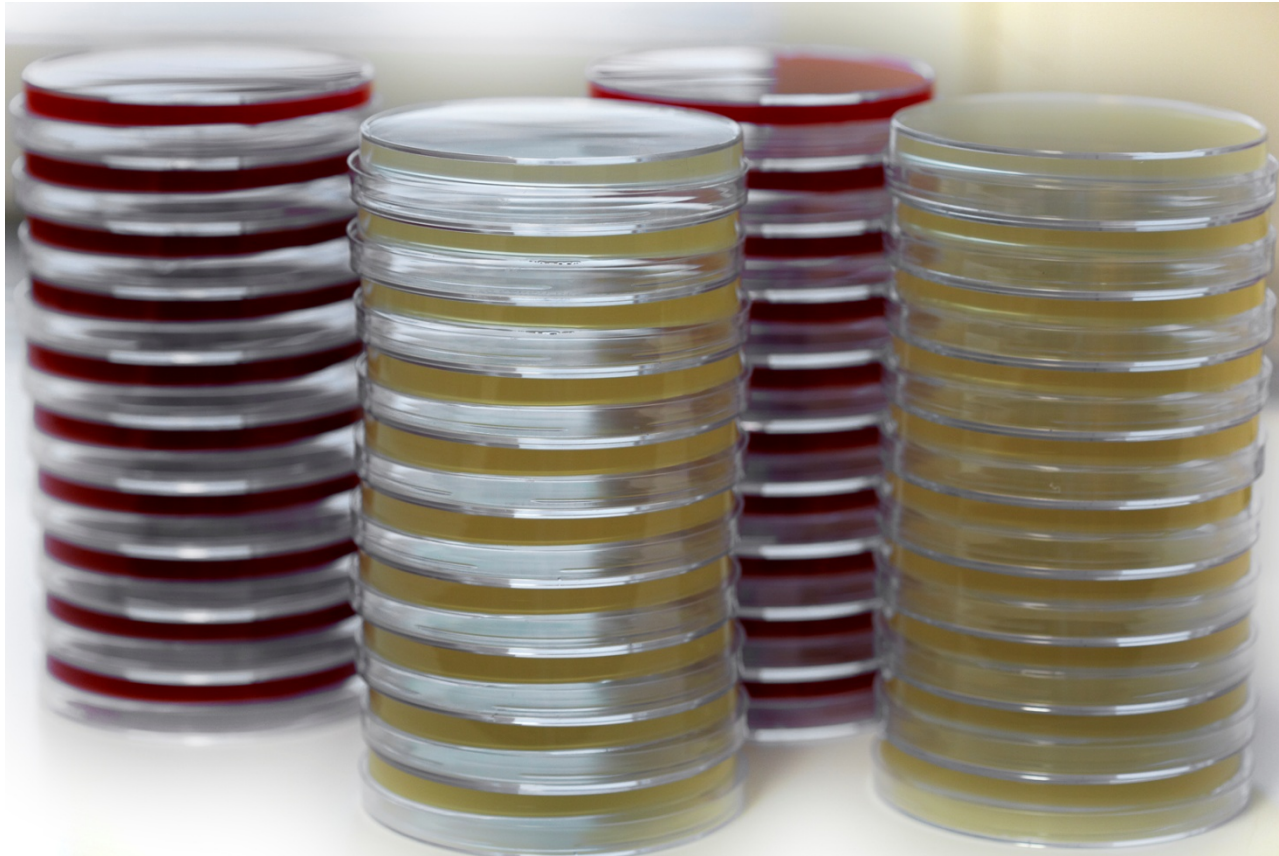
Contenidos

- Medios
- Preparación del inóculo
- Inoculación de las placas
- Discos
- Incubación
- Lectura de los halos de inhibición
- Interpretación
- CC (Control de Calidad)
- Análisis de los errores

Modificaciones a la presentación (diapositivas) del método de EUCAST de difusión con discos

- 18-12-2009: Presentación del método de EUCAST de difusión con discos publicado por primera vez en la página web de EUCAST
- 01-06-2010: Se han detallado aclaraciones referidas a la profundidad del agar en la diapositiva 7; Se han añadido los números de las cepas de la Colección Española de Cultivos Tipo en las diapositivas 29 y 30 (v. 1.1)

Medios para el estudio de la sensibilidad



Medios para el estudio de la sensibilidad

- Utilizar solamente agar Mueller-Hinton (MH).
- El medio para organismos exigentes (MH-F, *Mueller-Hinton Fastidious*) es MH con un 5% de sangre desfibrinada de caballo y 20 mg/L de β -nicotinamida adenina dinucleótido (NAD).

Medios para los diferentes microorganismos

Organismos	Medio
Enterobacteriaceae <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Acinetobacter</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Enterococcus</i> spp.	Agar Mueller-Hinton
<i>Streptococcus pneumoniae</i> Estreptococos de los Grupos A, B, C y G Otros estreptococos <i>Haemophilus</i> spp. <i>Moraxella catarrhalis</i>	Agar Mueller-Hinton + 5% de sangre desfibrinada de caballo + 20 mg/L de β -NAD (MH-F)
Otros organismos exigentes	Pendiente

Preparación de medios en el laboratorio

- Preparar el medio según las indicaciones del fabricante.
- No añadir la sangre o el NAD hasta que el medio se haya enfriado a 42-45°C (deberá disponerse de sistemas adecuados para medir la temperatura), mezclar bien y verter en las placas de inmediato.
- Verter el medio en las placas sobre una superficie plana para lograr una altura uniforme de $4,0 \pm 0,5$ mm. Si tras mediciones repetidas la altura resulta, de forma reproducible, por encima o por debajo de 4 mm, ajustar el volumen aun cuando la altura sea de 3,5-4,5 mm.
- En las placas de uso habitual los volúmenes de agar empleados son: 25 ml para una placa redonda de 90 mm de diámetro, ~ 31 ml para una placa redonda de 100 mm, ~ 71 ml para una placa redonda de 150 mm y ~ 40 ml para una placa cuadrada de 100 mm.

Control de calidad del agar Mueller-Hinton

Comprobar que todos los lotes de Mueller-Hinton cumplen con los controles requeridos para todas las combinaciones bacteria-antimicrobiano.

Problemas particulares:

- Los problemas de concentraciones altas o bajas de cationes divalentes pueden inferirse a partir de los halos de inhibición con los aminoglucósidos frente a la cepa control *P. aeruginosa* ATCC 27853.
- El exceso de timina y de timidina se puede demostrar si los halos de inhibición de trimetoprim-sulfametoxazol están por debajo del límite frente a la cepa control *E. faecalis* ATCC 29212.

Secado y almacenamiento de las placas de agar

- En el momento de su uso no deben observarse gotas de agua sobre la superficie del agar.
- Las placas no deben secarse en exceso.
- La forma de secado y almacenamiento de los medios preparados en los laboratorios dependerá de los equipos disponibles en cada uno de ellos.
- En el caso de los medios comerciales, se seguirán las indicaciones de almacenamiento recomendadas por el fabricante.

Inóculo

- El método requiere una suspensión del inóculo equivalente al 0,5 de la escala de McFarland *.

* Corresponde de manera aproximada a $1-2 \times 10^8$ UFC/ml de *E. coli*.



Seleccionar colonias bien aisladas

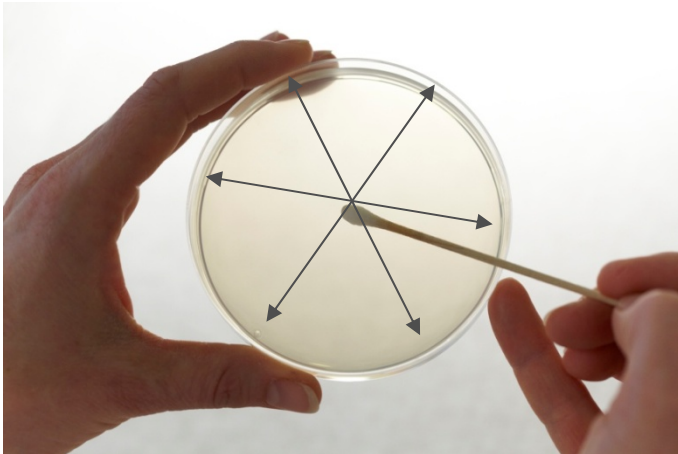


Preparación del inóculo

- Suspender de una a varias colonias en solución salina al 0.85% hasta lograr una suspensión uniforme de una turbidez visible igual a la densidad correspondiente al 0,5 de la escala de McFarland.
 - Excepción: *Streptococcus pneumoniae* debe suspenderse hasta alcanzar el 0,5 McFarland a partir de una placa de agar sangre pero hasta el 1.0 McFarland si es de una placa de agar chocolate.
- Ajustar la turbidez añadiendo más cantidad de bacterias o solución salina, midiendo hasta alcanzar el 0,5 de la escala de McFarland y empleando un dispositivo fotométrico.

Inoculación de las placas

- Utilizar la suspensión dentro de los 15 minutos una vez preparada y siempre antes de los 60 minutos.
- Introducir una torunda de algodón en la suspensión y eliminar el exceso de líquido presionando la torunda contra las paredes del tubo.
- Distribuir el inóculo uniformemente sobre la superficie de toda la placa inoculándola en tres direcciones o empleando un rotor de placas.



Evitar el exceso de inóculo en las placas

- Es importante no inocular las placas con un inóculo demasiado denso.
- Controlar que los diámetros de los halos frente a las cepas control se encuentran dentro del rango normal. Los inóculos elevados producen diámetros de halo más pequeños.
- Eliminar el exceso de líquido de la torunda presionándola levemente contra el interior del tubo (no escurrir excesivamente la torunda, particularmente con los microorganismos Gram-positivos) antes de inocular la placa.

Almacenamiento de los discos de antimicrobianos

- Almacenar los *stocks* de los discos en las condiciones recomendadas por el fabricante.
- Almacenar los discos en uso a 4-8°C en recipientes adecuadamente cerrados con un desecador y protegidos de la luz.
- Antes de abrir los envases de los discos, se deben dejar que adquieran la temperatura ambiente para evitar la condensación de agua. Es mejor mantener los discos a temperatura ambiente durante el día que ponerlos y quitarlos de la nevera repetidas veces.
- No utilizar discos más allá de la fecha de caducidad indicada en el envase.

Aplicación de los discos de antimicrobianos

- Los discos deben colocarse dentro de los 15 minutos de inoculación de la placa.
- Los discos deben quedar en contacto firme y uniforme con la superficie del medio.
- Los discos deben espaciarse de modo que los halos, en las cepas sensibles, no se superpongan. La superposición impedirá la medida de los diámetros de los halos.



Resumen del proceso de inoculación

- **Suspender colonias aisladas a partir de un cultivo de toda la noche en un medio no selectivo.**
- **Ajustar a una densidad equivalente al 0,5 de la escala de McFarland usando preferentemente un dispositivo fotométrico. Utilizar el inóculo dentro de los 15 minutos.**
- **Introducir una torunda en la solución y eliminar el exceso de líquido rotando la torunda contra la pared interna del tubo.**
- **Aplicar el inóculo mediante estrías uniformes sobre toda la superficie del agar.**
- **Aplicar los discos de antimicrobianos dentro de los 15 minutos de inoculación de la placa e incubar dicha placa dentro de los siguientes 15 minutos.**

Incubación de las placas

- Incubar las placas dentro de los 15 minutos de haber colocado los discos. Esto evita la predifusión que podría producir halos de mayor tamaño.
- No apilar un número grande de placas porque la temperatura no uniforme puede afectar el tamaño de los halos (esto depende de la eficiencia del incubador).
- El MH se incuba en aire y el MH-F en aire con un 4-6% de CO₂.

Incubación de las placas

Organismo	Condiciones de incubación
Enterobacteriaceae	35±1 °C en aire durante 16-20h
<i>Pseudomonas</i> spp.	35±1 °C en aire durante 16-20h
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	35±1 °C en aire durante 16-20h
<i>Acinetobacter</i> spp.	35±1 °C en aire durante 16-20h
<i>Staphylococcus</i> spp.	35±1 °C en aire durante 16-20h
<i>Enterococcus</i> spp.	35±1 °C en aire durante 16-20h
Estreptococos de los Grupos A, B, C y G	35±1 °C en aire con 4-6% de CO ₂ durante 16-20h
Otros estreptococos	35±1 °C en aire con 4-6% de CO ₂ durante 16-20h
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	35±1 °C en aire con 4-6% de CO ₂ durante 16-20h
<i>Haemophilus</i> spp.	35±1 °C en aire con 4-6% de CO ₂ durante 16-20h
<i>Moraxella catarrhalis</i>	35±1 °C en aire con 4-6% de CO ₂ durante 16-20h
Oros microorganismos exigentes	Pendiente

La regla de los 15-15-15 minutos

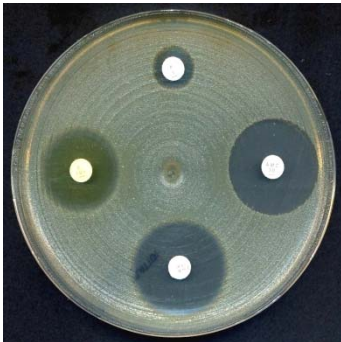
Prepare las placas de manera que usted:

- Use el inóculo dentro de los **15 minutos** después de su preparación y nunca más allá de los 60 minutos.
- Coloque los discos dentro de los **15 minutos** de inoculadas las placas.
- Inicie la incubación dentro de los **15 minutos** de aplicación de los discos.

Observación de las placas tras la incubación

- Si el inóculo es correcto y las placas han sido inoculadas adecuadamente se observará un desarrollo confluyente (“en césped”).
- El crecimiento uniforme permite obtener zonas de inhibición (halos) circulares uniformes (ver diapositiva siguiente).
- Si se observan colonias individuales esto indica que el inóculo es muy escaso por lo que debe repetirse la prueba de sensibilidad.

El crecimiento debe ser confluyente y estar extendido de manera uniforme sobre la superficie de la placa



Las placas deben tener este aspecto...

...y NO este otro!

Lectura de los halos

- Los bordes de los halos (zonas de inhibición) deben leerse en el punto de completa inhibición según se aprecie a simple vista.

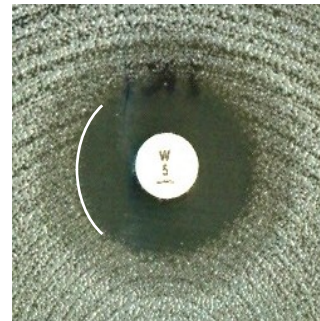
Ejemplos:



E. coli
Ciprofloxacino



S. aureus
Eritromicina



SCN
Trimetoprim



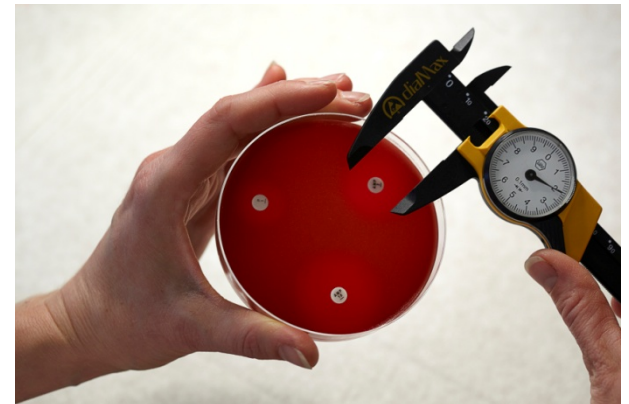
S. pneumoniae
Rifampicina

Lectura de halos

- Los diámetros de la zona de inhibición se miden con una regla, con un calibrador o con un lector automático.
- En el caso en que haya colonias individuales dentro de los halos, éstas deberán subcultivarse, confirmar su pureza y repetir la prueba de sensibilidad si fuera necesario.

Lectura de halos

- Leer las placas de **MH** por el reverso, contra un fondo negro iluminado con luz reflejada.
- Leer las placas de **MH-F** por el frente, sin la tapa e iluminadas con luz reflejada.



Lectura de halos: excepciones

Organismo	Antimicrobiano	Lectura de la zona de inhibición
<i>Proteus</i> spp.	Cualquiera	No considerar el <i>swarming</i>
<i>Streptococcus</i> spp.	Cualquiera	Leer inhibición de crecimiento y no la zona de hemólisis
Cualquiera	Trimetoprim Trimetoprim-sulfametoxazol	No considerar los crecimientos tenues dentro de los halos que tengan bordes bien definidos
<i>Staphylococcus</i> spp.	Linezolid	Observar con luz transmitida (sostener la placa a contraluz)
<i>Enterococcus</i> spp.	Vancomicina	Observar con luz transmitida (sostener la placa a contraluz)
Enterobacteriaceae	Ampicilina	No considerar crecimientos tenues que aparecen como halos internos en algunos lotes de agar MH

Interpretación de los halos

- Confirmar que los diámetros de inhibición para las cepas control están dentro de los rangos aceptables antes de interpretar la prueba de sensibilidad.
- Los diámetros de los halos (ajustados al milímetro) se interpretan dentro de las categorías de sensibilidad (S, I y R) de acuerdo con las tablas publicadas (www.eucast.org). De forma alternativa, se puede utilizar una plantilla con los puntos de corte de EUCAST.

Control del método de sensibilidad

- Utilizar las cepas control recomendadas para verificar que la prueba de sensibilidad está correctamente realizada (ver tablas [EUCAST Quality Control](#)).
- Para confirmar la capacidad de la prueba para detectar mecanismos de resistencia pueden utilizarse las cepas de control de calidad con mecanismos de resistencia definidos
- Las cepas control deben comprarse a las Colecciones de Cultivos u obtenerse de fuentes comerciales.

EUCAST: cepas de control de calidad empleadas en la rutina

Organismo	Números de la Colección de Cultivos	Características
<i>E. coli</i>	ATCC 25922; NCTC 12241; CIP 7624 DSM 1103; CCUG 17620; CECT 434	Sensible, cepa salvaje (<i>wild-type</i>)
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853; NCTC 12903; CIP 76110 DSM 1117; CCUG 17619; CECT 108	Sensible, cepa salvaje (<i>wild-type</i>)
<i>S. aureus</i>	ATCC 29213; NCTC 12973; CIP 103429 DSM 2569; CCUG 15915, CECT 794	Productor débil de β - lactamasa
<i>E. faecalis</i>	ATCC 29212; NCTC 12697; CIP 103214 DSM 2570; CCUG 9997; CECT 795	Sensible, cepa salvaje (<i>wild-type</i>)
<i>S. pneumoniae</i>	ATCC 49619; NCTC 12977; CIP 104340 DSM 11967; CCUG 33638	Sensibilidad intermedia a la penicilina
<i>H. influenzae</i>	NCTC 8468; CIP5494, CCUG 23946	Sensible, cepa salvaje (<i>wild-type</i>)

ATCC, American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852, USA.

NCTC, National Collection of Type Cultures, Health Protection Agency Centre for Infections, 61 Colindale Avenue, London NW9 5HT, UK.

CIP, Collection de Institut Pasteur, 25–28 Rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 France.

DSMZ, Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Mascheroder Weg 16, D-38124 Braunschweig, Germany.

CCUG, The Culture Collection University of Gothenburg <http://www.ccug.se/>

CECT. Colección Española de Cultivos Tipo. Universidad de Valencia. 46100. Burjassot. Valencia. Spain. <http://www.cect.org>

EUCAST: cepas empleadas para la detección de mecanismos específicos de resistencia (en desarrollo)

Organismo	Números de la Colección de Cultivos	Características
<i>E. coli</i>	ATCC 35218; NCTC 11954; CIP 102181; DSM 5564; CCUG 30600; CECT 943	Productor de la β -lactamasa TEM-1
<i>S. aureus</i>	NCTC 12493	Heterorresistente a oxacilina, <i>mecA</i> positiva
<i>H. influenzae</i>	ATCC 49247; NCTC 12699; CIP 104604; DSM 9999 CCUG 26214	β -lactamasa negativa, resistente a ampicilina (BLNAR)

ATCC, American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852, USA.

NCTC, National Collection of Type Cultures, Health Protection Agency Centre for Infections, 61 Colindale Avenue, London NW9 5HT, UK.

CIP, Collection de Institut Pasteur, 25–28 Rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 France.

DSMZ, Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Mascheroder Weg 16, D-38124 Braunschweig, Germany.

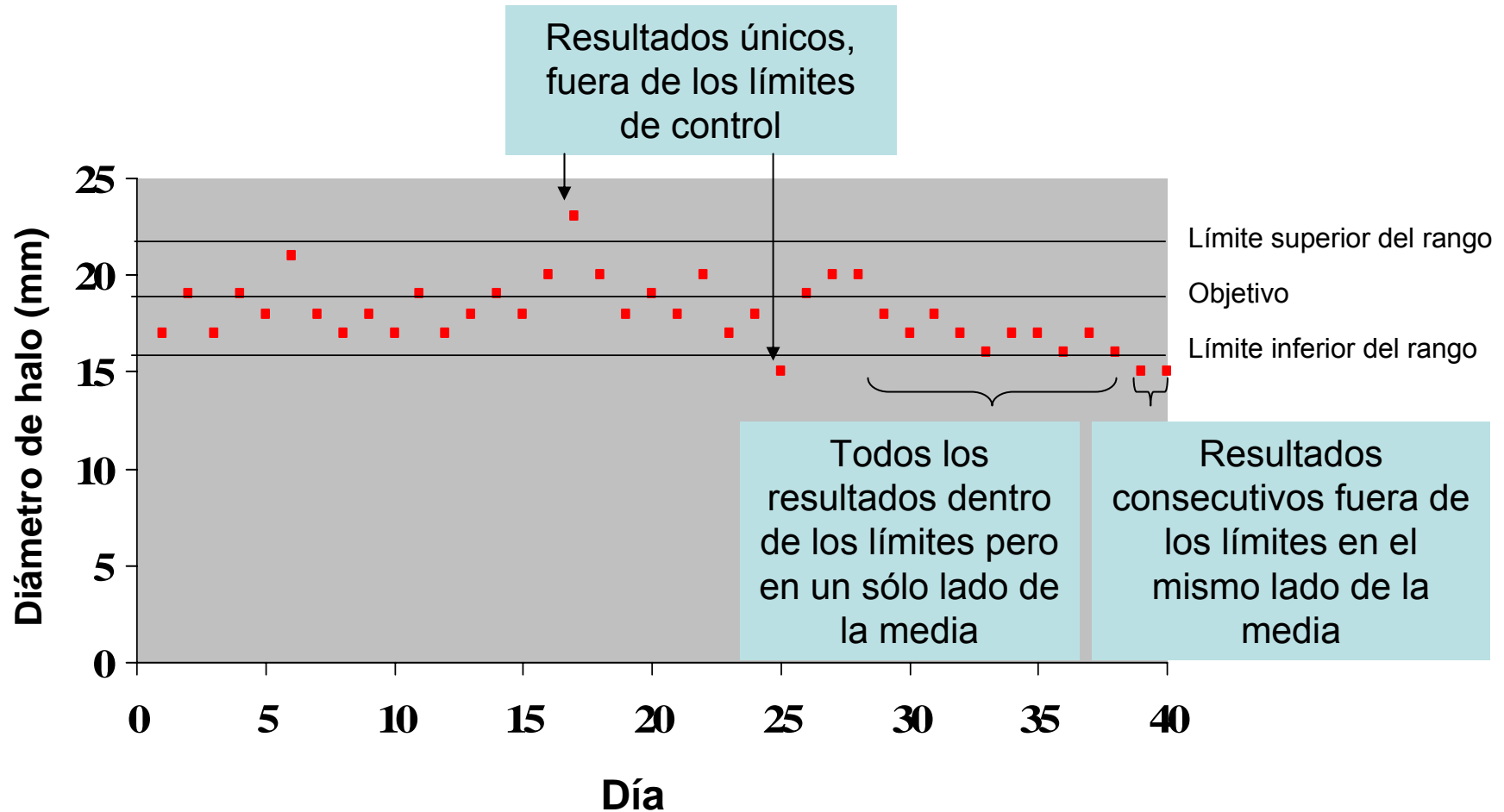
CCUG, The Culture Collection University of Gothenburg <http://www.ccug.se/>

CECT. Colección Española de Cultivos Tipo. Universidad de Valencia. 46100. Burjassot. Valencia. Spain. <http://www.cect.org>

Utilización de cepas de control de calidad para conocer la adecuación general de la técnica

- Deben hacerse controles diarios, al menos de aquellos antimicrobianos que están incluidos en los paneles de rutina.
- Cada día que se realicen controles de calidad, los resultados deben compararse con los obtenidos en los 20 últimos controles consecutivos anteriores.
- Examinar los resultados para ver las tendencias y los halos de inhibición que estén, consistentemente, por encima o por debajo de la media.
- Se requerirá investigar las causas cuando dos o más de los 20 controles estén fuera del rango.

Control de la adecuación de la prueba de sensibilidad



Acciones ante los resultados de CC fuera del rango

- Si dos diámetros no consecutivos (para las cepas control) de los 20 controles están fuera del rango aceptable, informar los resultados de sensibilidad e investigar las posibles causas.
- Si dos diámetros consecutivos (para las cepas control) de las 20 pruebas están fuera del rango aceptable, investigar las causas antes de informar los resultados de sensibilidad. Los controles deberían repetirse.
- Si varios discos (>2) están fuera del rango en un mismo día, investigar las causas antes de informar los resultados de sensibilidad. Los controles deberían repetirse.
- Si no se detecta la resistencia de una cepa control resistente, suprimir los resultados del estudio de sensibilidad, investigar las causas y volver a determinar la sensibilidad.

Almacenamiento y subcultivo de las cepas control

- Guardar las cepas a -70 °C en tubos con bolitas de cerámica y caldo glicerol: un vial “en uso” y uno “archivado”.
Alternativamente, pueden usarse cultivos deshidratados congelados o sistemas comerciales de almacenamiento.
- Subcultivar semanalmente, a partir del vial en uso, en un medio adecuado, no selectivo y controlar la pureza.
- Subcultivar de la placa de pureza, cada día, durante siete días.
- Los microorganismos exigentes sólo deben ser subcultivados de forma seriada durante 6 días.
- Cuando el vial de uso se haya agotado, subcultivar del vial archivado y preparar otro vial de uso a partir del subcultivo.

Fuentes potenciales de error (1)

Medio	Almacenamiento de placas
	No preparado según las instrucciones
	Variaciones entre lotes o cambio de proveedor del agar
	Suplementos (variaciones entre lotes, cantidad incorrecta o caducado)
	pH
	Profundidad del agar/volumen del agar
	Fecha de caducidad
Condiciones del desarrollo de la prueba	No seguimiento de la regla “15-15-15”- (utilización de la suspensión dentro de los 15 min., colocación de los discos dentro de los 15 min., incubación dentro de los 15 min.)
	Incubación (temperatura, atmósfera y tiempo)
	Inoculación incorrecta (muy débil, muy densa o no uniforme)
	Condiciones de lectura
	Lectura de los bordes de los halos

Fuentes potenciales de error (2)

Discos	Disco incorrecto (agente incorrecto o concentración incorrecta)
	Potencia del disco (almacenamiento inadecuado, agente lábil, fecha de caducidad)
	Los discos no han estado a temperatura ambiente una vez abierto el envase.
	Demasiados discos en una placa (interferencia entre los halos de inhibición)
Microorganismos de control	Cepa control incorrecta
	Mutación
	Contaminación
	Antigüedad del cultivo

EUCAST: página *web*

- Consulte periódicamente la página *web* de EUCAST para ver las actualizaciones en la metodología, los rangos de cepas del control de calidad y los puntos de corte.

www.eucast.org

- Por favor, envíe sus comentarios y sugerencias a erika.matuschek@ltkronoberg.se o a la secretaría de EUCAST (ver página *web*).



EUCAST

EUROPEAN COMMITTEE
ON ANTIMICROBIAL
SUSCEPTIBILITY TESTING

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases