



EUCAST

EUROPEAN COMMITTEE
ON ANTIMICROBIAL
SUSCEPTIBILITY TESTING

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

Teste sensibilidade aos antimicrobianos

Método de disco-difusão EUCAST

1

Versão 5.0
Janeiro
2015



Versão para Português
válida a partir de
01/03/2016

	Conteúdo	Página
	Alterações no documento	3
	Abreviaturas e Terminologia	5
1	Introdução	6
2	Preparação e armazenamento dos meios	7
3	Preparação do inóculo	9
4	Inoculação das placas de ágar	11
5	Aplicação dos discos de antimicrobianos	12
6	Incubação das placas	13
7	Observação das placas após incubação	15
8	Aferição dos halos e interpretação	16
9	Controle de Qualidade	19
	Apêndice A	23



Alterações no documento

Versão	Alterações	Data
5.0	<i>E. coli</i> ATCC 25922 movida do CQ estendido (Tabela 5) para CQ de rotina (Tabela 4).	Janeiro 2015
5.0	Tabela 4: Adicionada nota sobre a remoção da cepa <i>H. influenzae</i> NCTC 8468	Janeiro 2015
5.0	Tabela 4: <i>H. influenzae</i> ATCC 49766 adicionado.	Janeiro 2015
4.0	Seção 2.7: Nova seção sobre estocagem e manuseio de placas de ágar MH-F.	Junho 2014
4.0	Tabelas 1 e 3: <i>Corynebacterium</i> spp. adicionado.	Junho 2014
4.0	Seção 5.3.1: Revisão da disposição dos discos para detectar resistência induzível à clindamicina em estreptococos.	Junho 2014
3.0	Seção 2.1 e 2.4: Esclarecimento sobre preparação e estocagem dos meios.	Abril 2013
3.0	Tabelas 1 e 3: Adição de <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>C. coli</i>	Abril 2013
3.0	Seção 3.2.2: Esclarecimento quanto ao uso do padrão de turbidez.	Abril 2013
3.0	Seção 4.1: Esclarecimento quanto ao uso da suspensão para inóculo.	Abril 2013
3.0	Seção 5.3: Esclarecimento quanto ao número de discos de antimicrobianos em cada placa de ágar.	Abril 2013
3.0	Seção 5.3.1 Nova seção. Disposição dos discos para detectar resistência induzível à clindamicina.	Abril 2013
3.0	Seção 8.8.2: Informações específicas sobre leitura dos halos de sulfametoxazol-trimetoprim ao testar <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .	Abril 2013
3.0	Tabela 4: Adicionado <i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33560.	Abril 2013
3.0	Tabela 5: Adição de números DSM e CCUG para <i>E. faecalis</i> ATCC 51299	Abril 2013
3.0	Apêndice A: Nova seção. Metodologia EUCAST para teste de disco-difusão para <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>C. coli</i>	Abril 2013

2.1	Seção 8: Numeração revisada. Seções Novas/revisadas: 8.1 e 8.4.	Fevereiro 2012
2.0	Seção 2.2: Esclarecimento sobre espessura do ágar.	Janeiro 2012
2.0	Tabelas 1 & 3: Nova terminologia (<i>Streptococcus</i> do grupo Viridans). <i>Listeria monocytogenes</i> adicionada.	Janeiro 2012
2.0	Seção 8: Revisão da numeração. Seções Novas/revisadas: 8.1, 8.7, 8.7.3, 8.7.4, 8.7.6, 8.7.9 e 8.7.10.	Janeiro 2012
2.0	Tabela 5: Cepas <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603 e <i>E. faecalis</i> ATCC 51299 adicionadas.	Janeiro 2012
2.0	Tabelas 4 & 5 e Abreviaturas: Números da Spanish Culture Collection adicionados.	Janeiro 2012
1.0	Primeira edição	Dezembro 2009

Abreviaturas e terminologia

ATCC	American Type Culture Collection http://www.atcc.org
BLNAR	β -Lactamase negativa, ampicilina resistente
CCUG	Culture Collection University of Göteborg http://www.ccug.se
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo http://www.cect.org
CIP	Collection de Institut Pasteur http://www.cabri.org/CABRI/srs-doc/cip_bact.info.html
DSM	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) http://www.dsmz.de/index.htm
ESBL	β -lactamase de espectro estendido
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing http://www.eucast.org
MH	Ágar Mueller-Hinton
MH-F	Ágar Mueller-Hinton - para microrganismos fastidiosos (MH suplementado com 5% de sangue desfibrinado de cavalo e 20 mg/L de β -NAD)
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à oxacilina (metecilina) [com gene <i>mecA</i> ou <i>mecC</i>]
NCTC	National Collection of Type Cultures http://www.hpacultures.org.uk
β -NAD	β -nicotinamida-adenina-dinucleotídio
Salina	Uma solução de NaCl a 0,85% em água

1 Introdução

O método de disco-difusão é uma das abordagens mais antigas para realização de testes de sensibilidade antimicrobiana e permanece como um dos mais amplamente utilizados na rotina dos laboratórios clínicos. É adequado para testar a maioria dos patógenos bacterianos, incluindo as bactérias fastidiosas mais comuns e é versátil em relação a gama de agentes antimicrobianos que podem ser testados e não requer equipamento especial.

Da mesma forma que várias outras técnicas de disco-difusão, o método EUCAST é um método padronizado baseado nos princípios definidos no relatório do International Collaborative Study of Antimicrobial Susceptibility Testing de 1972, e a experiência dos grupos de especialistas em todo o mundo.

Os pontos de corte dos halos de inibição no método EUCAST são calibrados para os pontos de corte europeus harmonizados que estão publicados pelo EUCAST e são gratuitamente disponíveis no site do EUCAST (<http://www.eucast.org>). A versão dessas tabelas em Português está disponível no site do BrCAST (www.brcast.org.br).

Assim como todos os métodos, as técnicas descritas devem ser seguidas sem modificações com objetivo de gerar resultados confiáveis.

Textos incluídos pelo BrCAST estão marcados em verde.

2 Preparação e armazenamento de meios

- 2.1 Preparar o ágar MH de acordo com as instruções do fabricante, com suplementação para microrganismos fastidiosos como indicado na Tabela 1. A preparação e adição de suplementos estão descritas em detalhes no <http://www.eucast.org>. A versão desses documentos em Português está disponível no site do BrCAST (<http://brcast.org.br>).
- 2.2 O meio deve ter uma espessura de $4,0 \pm 0,5$ mm (aproximadamente 25 mL em uma placa circular de 90 mm de diâmetro, 31 mL em uma placa circular de 100 mm de diâmetro, 71 mL em uma placa circular de 150 mm de diâmetro, 40 mL em uma placa quadrada de 100 mm).
- 2.3 A superfície do ágar deve estar seca antes do uso. A necessidade ou não de secagem e o tempo necessário para secar a superfície do ágar depende das condições de armazenamento e de secagem. Não secar as placas excessivamente.
- 2.4 Armazenar as placas, preparadas no laboratório, a 8-10°C. Se as placas forem armazenadas por mais de 7 dias, é necessário utilizar uma alternativa de armazenamento como utilizar sacos plásticos selados e armazená-las na temperatura de 4-8°C.
- 2.5 Para placas preparadas no laboratório, a secagem, condições de estocagem e estabilidade devem ser determinadas como parte do programa de garantia da qualidade do laboratório.
- 2.6 Placas preparadas comercialmente devem ser estocadas de acordo com o recomendado pelo fabricante e utilizadas dentro do prazo de validade.
- 2.7 Para placas de MH-F¹ (preparadas no laboratório ou comercialmente), estocadas em sacos plásticos ou em recipientes selados, pode ser necessária a secagem antes do uso. Isto é necessário para impedir o excesso de umidade, que pode resultar em halos com bordas distorcidas e/ou névoa no interior dos halos.

¹ MH + 5% de sangue desfibrinado mecanicamente de cavalo + 20 mg/L β-NAD

Tabela 1 Meio para teste de sensibilidade aos antimicrobianos	
Microrganismo	Meio
<i>Enterobacteriaceae</i>	Ágar MH
<i>Pseudomonas</i> spp.	Ágar MH
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Ágar MH
<i>Acinetobacter</i> spp.	Ágar MH
<i>Staphylococcus</i> spp.	Ágar MH
<i>Enterococcus</i> spp.	Ágar MH
Streptococcus do grupo A, B, C e G	Ágar MH-F ¹
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Ágar MH-F ¹
Viridans group streptococci	Ágar MH-F ¹
<i>Haemophilus</i> spp.	Ágar MH-F ¹
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Ágar MH-F ¹
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ágar MH-F ¹
<i>Pasteurella multocida</i>	Ágar MH-F ¹
<i>Campylobacter jejuni</i> e <i>coli</i>	Ágar MH-F ¹ (ver Apêndice A)
<i>Corynebacterium</i> spp	Ágar MH-F ¹
Outros microrganismos fastidiosos	Pendente

¹MH + 5% sangue desfibrinado mecanicamente de cavalo + 20 mg/L β-NAD

3 Preparação do inóculo

- 3.1 Usar o método de suspensão direta das colônias em salina para fazer a suspensão de microrganismos de modo a obter densidade equivalente ao padrão de turbidez 0,5 da escala McFarland (Tabela 2), que corresponde aproximadamente a $1-2 \times 10^8$ UFC/mL para *Escherichia coli*. O método da suspensão direta das colônias é apropriado para todos os microrganismos, incluindo os microrganismos fastidiosos como *Haemophilus* spp., *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*, estreptococos beta hemolíticos e outros estreptococos.
- 3.1.1 Preparar a suspensão a partir de um crescimento *overnight* em um meio não seletivo. Usar várias colônias morfológicamente similares (quando possível) para evitar selecionar variantes atípicas e suspenda as colônias em salina com alça estéril ou swab de algodão.
- 3.2 Ajustar a suspensão do inóculo de modo a obter turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland. Um inóculo mais denso pode resultar halos menores e inóculo com menor densidade terá um efeito oposto.
- 3.2.1 É recomendado que um dispositivo fotométrico seja utilizado para ajustar a densidade da suspensão. O fotômetro deve ser calibrado com o padrão 0,5 da escala de McFarland, de acordo com as instruções do fabricante.
- 3.2.2 Alternativamente, a densidade da suspensão pode ser comparada visualmente com a turbidez do padrão 0,5 da escala de McFarland. Agitar vigorosamente o padrão em um vortex antes do uso (alguns padrões comerciais são baseados em gel e não devem ser agitados; portanto deve-se seguir as instruções do fabricante). Para auxiliar a comparação, comparar o teste e padrão contra um fundo branco com linhas pretas.
- 3.2.3 As suspensões de *Streptococcus pneumoniae* devem ser preferencialmente preparadas a partir de cultura obtida em de ágar sangue de modo a obter densidade equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland. Quando a suspensão for preparada a partir de cultura em ágar chocolate, a turbidez do inóculo deve ser equivalente ao padrão 1.0 da escala de McFarland.
- 3.2.4 Ajustar a densidade da suspensão em 0,5 da escala de McFarland adicionando salina ou mais microrganismos.
- 3.3 A suspensão deve ser utilizada de preferência em até 15 min e obrigatoriamente até 60 min após a preparação.

Tabela 2	Preparação do padrão 0,5 de McFarland
1	Adicionar 0,5 mL de solução de BaCl ₂ 0,048 mol/L (1,175% w/v BaCl ₂ ·2H ₂ O) a 99,5 mL de solução de H ₂ SO ₄ 0,18 mol/L (0,36 N) (1% v/v) e misturar bem.
2	Confirir a densidade óptica da suspensão em um espectrofotômetro com percurso óptico de 1 cm e cubeta apropriada. A absorbância em 625 nm deve ser na faixa de 0,08 to 0,13.
3	Distribuir a suspensão em tubos de mesmo tamanho que aqueles utilizados para testar o ajuste do inóculo. Vedar os tubos.
4	Armazenar os padrões vedados no escuro, em temperatura ambiente.
5	Agitar os padrões vigorosamente em um misturador vórtex imediatamente antes do uso.
6	Substituir a escala a cada 6 meses.
7	Os padrões adquiridos comercialmente devem ser verificados para assegurar que a absorbância está dentro dos limites aceitáveis.

4 Inoculação das placas de ágar.

- 4.1 Preferencialmente utilizar a suspensão ajustada do inóculo em até 15 minutos após a preparação. A suspensão deve ser obrigatoriamente utilizada em até 60 minutos após a preparação.
- 4.2 Mergulhar um swab de algodão estéril dentro da suspensão e remover o excesso de girando-o **sobre seu próprio eixo, contra a parte interna do tubo, acima do nível suspensão.** É importante remover o excesso de suspensão do swab para evitar a inoculação excessiva das placas, particularmente em microrganismos Gram-negativos.
- 4.3 Espalhar o inóculo uniformemente sobre a superfície da placa semeando o inóculo em três direções diferentes, ou utilizar um semeador automático.
- 4.4 Aplicar os discos em até 15 minutos após a inoculação da placa.

Se as placas inoculadas forem deixadas em temperatura ambiente por períodos prolongados de tempo antes da aplicação dos discos, os microrganismos podem começar a crescer, resultando em redução errônea do tamanho dos halos de inibição. Os discos devem ser aplicados na superfície do ágar em até 15 minutos após a inoculação.

5 Aplicação dos discos de antimicrobianos

- 5.1 O conteúdo (potência) dos discos a serem utilizados está descrito nas tabelas de pontos de corte e controle de qualidade em <http://www.eucast.org>. **A versão desses documentos em Português está disponível no site do BrCAST (<http://brcast.org.br>).**
- 5.2 Aplicar os discos firmemente na superfície da placa de ágar inoculada e seca. O contato com o ágar deve ser completo. Os discos não podem ser removidos após a aplicação nas placas, uma vez que a difusão dos agentes antimicrobianos dos discos é muito rápida.
- 5.3 O número de discos nas placas deve ser limitado para impedir sobreposição dos halos e a interferência entre os antimicrobianos. É importante que os diâmetros dos halos sejam medidos corretamente. O número máximo de discos varia de acordo com o microrganismo e a seleção dos discos. Normalmente, 6 e 12 discos são os números máximos possíveis, respectivamente em placas circulares de 90 e 150 mm.
- 5.3.1 Para detecção da resistência induzível à clindamicina em estafilococos e estreptococos, os discos de eritromicina e clindamicina devem ser posicionados em uma distância de borda a borda de 12-20 mm para os estafilococos e 12-16 mm para estreptococos.
- 5.4 A perda de potência dos agentes antimicrobianos contidos nos discos resulta na redução dos diâmetros dos halos e é uma fonte comum de erro. Os cuidados listados a seguir são essenciais:
- 5.4.1 Armazenar os discos, incluindo os que estão em dispensadores, em embalagens fechadas com dessecador (sílica gel) e protegidos da luz (alguns agentes como **rifampicina, tigeciclina**, metronidazol, cloranfenicol e fluorquinolonas, são inativados por exposição prolongada à luz). **Especial atenção a refrigeradores e freezer com porta de vidro!**
- 5.4.2 Armazenar os discos em estoque a -20°C a menos que o fabricante indique uma temperatura diferente.
- 5.4.3 Armazenar os discos em uso a < 8°C.
- 5.4.4 Para evitar condensação e acúmulo de umidades nos discos, deixar os recipientes contendo os discos adquirirem temperatura ambiente antes de abri-los.
- 5.4.5 Descartar os discos na data de expiração indicada na embalagem.

6 Incubação das placas

- 6.1 Inverter as placas e incubar em até 15 minutos após a aplicação dos discos. Se as placas forem deixadas em temperatura ambiente após a aplicação dos discos, a pré-difusão pode resultar em halos de inibição erroneamente aumentados.
- 6.2 O empilhamento das placas na estufa altera os resultados devido ao aquecimento desigual entre elas. A eficiência das estufas varia e dessa forma o controle de incubação, incluindo o número apropriado de placas empilhadas deve fazer parte do programa de garantia de qualidade do laboratório.
- 6.3 Incubar as placas de acordo com as condições apresentadas na Tabela 3.
- 6.4 Para testes de sensibilidade dos glicopeptídeos com algumas cepas de *Enterococcus* spp, colônias resistentes não são visíveis até que as placas tenham sido incubadas por 24 horas completas. Mesmo assim, as placas podem ser examinadas depois de 16-20 horas e qualquer resistência reportada, mas placas de isolados aparentemente sensíveis devem ser reincubadas e novamente lidas com 24h.

Tabela 3 - Condições de incubação para placas de teste de sensibilidade

Microrganismo	Condições de incubação
<i>Enterobacteriaceae</i>	35±1°C em ar por 16-20 h
<i>Pseudomonas</i> spp.	35±1°C em ar por 16-20 h
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	35±1°C em ar por 16-20 h
<i>Acinetobacter</i> spp.	35±1°C em ar por 16-20 h
<i>Staphylococcus</i> spp.	35±1°C em ar por 16-20 h
<i>Enterococcus</i> spp.	35±1°C em ar por 16-20 h
	(35±1°C em ar por 24 h para glicopeptídeos)
<i>Streptococcus</i> sp. grupos A, B, C e G	35±1°C em ar com 4-6% de CO ₂ por 16-20 h
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	35±1°C em ar com 4-6% de CO ₂ por 16-20 h
Estreptococos do grupo Viridans	35±1°C em ar com 4-6% de CO ₂ por 16-20 h
<i>Haemophilus</i> spp.	35±1°C em ar com 4-6% de CO ₂ por 16-20 h
<i>Moraxella catarrhalis</i>	35±1°C em ar com 4-6% de CO ₂ por 16-20 h
<i>Listeria monocytogenes</i>	35±1°C em ar com 4-6% de CO ₂ por 16-20 h
<i>Pasteurella multocida</i>	35±1°C em ar com 4-6% de CO ₂ por 16-20 h
<i>Campylobacter jejuni</i> e <i>C. coli</i>	Ver apêndice A
<i>Corynebacterium</i> spp.	35±1°C em ar com 4-6% de CO ₂ por 16-20 h
	Isolados com crescimento insuficiente em 16-20 h devem ser reincubados imediatamente e os halos de inibição devem ser lidos após um total de 40-48 h de incubação.
Outros microrganismos	Pendente

7 Observação das placas após incubação

- 7.1 Um inóculo adequado e placas satisfatoriamente semeadas devem resultar em crescimento confluyente.
- 7.2 O crescimento deve ser uniformemente distribuído na placa para obter halos de inibição uniformemente circulares (não distorcidos)
- 7.3 Quando forem observadas colônias isoladas, o inóculo é muito escasso e o teste deve ser repetido.
- 7.4 Verificar se os diâmetros dos halos de inibição das cepas de controle de qualidade estão dentro dos limites aceitáveis.

8 Aferição e interpretação dos diâmetros dos halos de inibição

- 8.1 Para todos os antimicrobianos, as bordas dos halos devem ser lidas no ponto de completa inibição do crescimento, visto a olho nu, com a placa posicionada a **cerca de** 30 cm dos olhos.
- 8.2 Ler as placas de ágar Mueller-Hinton não suplementadas pelo seu fundo, com luz refletida contra um fundo escuro.
- 8.3 Ler as placas de ágar Mueller-Hinton suplementadas com a tampa removida, observando a superfície contendo os discos, sob luz refletida.
- 8.4 Não utilizar luz transmitida (placas observadas contra a luz) ou lupa, exceto quando indicado (veja abaixo).
- 8.5 Aferir os diâmetros dos halos de inibição em milímetros com uma régua, paquímetro ou leitor automatizado.
- 8.6 Interpretar os diâmetros dos halos de acordo com valores de corte contidos nas tabelas em <http://www.eucast.org>. **A versão desses documentos em Português está disponível no site do BrCAST (<http://brcast.org.br>).**
- 8.7 Se um padrão for utilizado para interpretar os diâmetros dos halos, a placa deve ser colocada sobre o padrão e os halos interpretados de acordo com os valores de corte do EUCAST contidos no modelo. Certifique-se de que os valores de corte utilizados estão de acordo com a última versão da tabela dos valores de corte do EUCAST. Um programa para preparação dos padrões está disponível livremente no: <http://bsac.org.uk/susceptibility/template-program>.
- 8.8 **Instruções específicas de leitura:**
- 8.8.1 O crescimento de pequenas colônias dentro do halo de inibição deve ser subcultivado e identificado, **o teste deve ser repetido, pois podem corresponder a mutantes resistentes ou mistura de microrganismos.**

8.8.2 Antagonistas no meio podem resultar em um crescimento reduzido dentro do halo de inibição, até o disco, com sulfonamida ou trimetoprim. Este crescimento deve ser ignorado e o diâmetro do halo aferido na borda mais nítida do halo.

Para *Stenotrophomonas maltophilia*, ao testar sulfametoxazol-trimetoprim, o crescimento no interior do halo de inibição pode ser substancial. Tal crescimento deve ser ignorado e o halo de inibição deve ser lido onde a borda do halo possa ser vista. Ler como ausência de halo somente se houver crescimento até o disco e se não houver qualquer halo de inibição. **Observar as figuras que estão disponíveis na Tabela de Pontos de Corte Clínicos.**

8.8.3 Para *Enterobacteriaceae*, ao testar ampicilina, ignorar o crescimento que possa aparecer como uma fina película produzida no interior do halo em alguns lotes de ágar Mueller-Hinton.

8.8.4 Para *E. coli*, ao testar mecilinam, desprezar colônias isoladas dentro do halo de inibição.

8.8.5 Para *Proteus* spp., ignore o véu (*swarming*) e ler a inibição do crescimento.

8.8.6 Para estafilococos, ao testar benzilpenicilina, examinar a borda do halo com a placa voltada contra a luz (luz transmitida). Isolados com valores de diâmetro do halo de inibição \geq aos valores de corte de sensibilidade, mas com bordas bem definidas, devem ser reportados como resistentes à benzilpenicilina. **Observar as figuras que estão disponíveis na Tabela de Pontos de Corte Clínicos.**

- 8.8.7 Quando a cefoxitina for utilizada para detecção da resistência à oxacilina (metecilina) em *Staphylococcus aureus*, afirir o halo evidente e examinar os halos cuidadosamente contra a luz para detectar colônias dentro do halo. Isto pode ser devido a uma **mistura de microrganismos** ou expressão de resistência heterogênea à oxacilina (metecilina).

- 8.8.8 Ler os testes de sensibilidade de linezolida a partir do fundo da placa, com a placa contra a luz (luz transmitida).

- 8.8.9 Para *Enterococcus*, ao testar vancomicina, inspecionar as bordas do halo de inibição cuidadosamente com a placa contra a luz (luz transmitida). Bordas irregulares e colônias dentro do halo de inibição indicam resistência à vancomicina e devem ser feitos testes complementares. **Ver recomendações na Tabela de Pontos de Corte Clínicos.**

- 8.8.10 Para estreptococos hemolíticos no meio MH-F, ler a inibição de crescimento e não a inibição da hemólise. A β -Hemólise é usualmente independente do crescimento, enquanto α -hemólise e o crescimento geralmente coincidem.

9 Controle de Qualidade

9.1 Utilizar as cepas de controle especificadas (Tabela 4) para monitorar o desempenho do teste. As cepas de controle principais recomendadas são cepas tipicamente sensíveis, mas cepas resistentes também podem ser utilizadas para confirmar que um método é capaz de detectar resistência mediada por mecanismos de resistência conhecidos (Tabela 5). Estas cepas podem ser adquiridas de coleções de cultura e através de fontes comerciais.

9.2 Armazenar as cepas controle em condições que mantenham a viabilidade e característica dos microrganismos. O armazenamento em **miçangas** em caldo glicerol a -70°C (**caldo TSB com glicerol a 15% ou equivalente comercial**) é um método conveniente. Microrganismos não fastidiosos podem ser armazenados a -20°C. Pelo menos dois tubos de cada cepa controle devem ser armazenados, um para uso e outro como reserva para reposição do tubo em uso quando necessário.

9.3 Semanalmente subcultivar uma miçanga do tubo em uso em meio não seletivo apropriado e verificar a pureza. Desta cultura pura, preparar um subcultivo para cada dia da semana. Para microrganismos fastidiosos que não sobrevivem na placa por 5 a 6 dias, subcultivar a cepa diariamente por não mais do que uma semana.

9.4 Os intervalos aceitáveis para as cepas controle são listados no <http://www.eucast.org>. **A versão desses documentos em Português está disponível no site do BrCAST (<http://brcast.org.br>).**

9.5 Utilizar as cepas recomendadas para controle de qualidade de rotina para monitorar o desempenho dos testes. Os testes controle devem ser realizados e verificados diariamente, pelo menos para antibióticos que fazem parte dos painéis de rotina. A cada dia que os testes forem realizados, verificar os resultados por pelo menos 20 dias consecutivos. Verificar os resultados quanto à ocorrência de tendência ou diâmetros de halos consistentemente acima ou abaixo do alvo. Caso 2 ou mais testes estejam fora do limite, é necessário uma investigação.

9.6 As cepas de controle de qualidade devem ser testadas diariamente até que o desempenho se mostre satisfatório. (não mais que 1 em 20 testes fora dos limites estabelecidos). Neste estágio, a frequência pode ser reduzida para semanal. Se o desempenho esperado não for obtido, a causa deve ser investigada.

9.7 Em adição com o CQ de rotina, testar cada novo lote de ágar Mueller-Hinton **ou disco** para se garantir que os halos estão dentro dos limites aceitáveis.

Os discos de aminoglicosídeos podem revelar variações inaceitáveis de cátions divalentes no meio, a tigeciclina pode mostrar variações no magnésio, sulfametoxazol-trimetoprim pode mostrar problemas como conteúdo de timina e eritromicina pode revelar pH inaceitável.

9.8 Para facilitar a análise dos resultados de CQ recomendamos o uso do gráfico de Levey-Jennings disponível no site www.brcast.org.br.

9.9 Ao analisar problemas de controle de qualidade tenha em mente que problemas com o ágar Mueller-Hinton usualmente afetam toda uma classe de antimicrobianos, enquanto problemas com a potência do disco restringem-se ao disco em questão.

Tabela 4: Cepas para controle de qualidade de rotina		
Microrganismo	Cepa	Características
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Sensível, selvagem
	NCTC 12241	
	CIP 7624	
	DSM 1103	
	CCUG 17620	
	CECT 434	
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35218	β-lactamase TEM-1 , resistente a ampicilina
	NCTC 11954	
	CIP 102181	
	DSM 5564	
	CCUG 30600	
	CECT 943	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Sensível, selvagem
	NCTC 12934	
	CIP 76110	
	DSM 1117	
	CCUG 17619	
	CECT 108	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	Fraco produtor de β-lactamase
	NCTC 12973	
	CIP 103429	
	DSM 2569	
	CCUG 15915	
	CECT 794	
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	Sensível, selvagem
	NCTC 12697	
	CIP 103214	
	DSM 2570	
	CCUG 9997	
	CECT 795	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 49619	Sensibilidade reduzida à benzilpenicilina
	NCTC 12977	
	CIP 104340	
	DSM 11967	
	CCUG 33638	
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 49766	Sensível, selvagem
	NCTC 12975	
	CIP 103570	
	DSM 11970	
	CCUG 29539	
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33560	Sensível, selvagem Ver Apêndice A para condições de teste
	NCTC 11351	
	CIP 702	
	DSM 4688,	
	CCUG 11284	

Tabela 5: Cepas de controle para detecção de mecanismos específicos de resistência (CQ estendido)		
Microrganismo	Cepa	Características
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603 NCTC 13368 CCUG 45421 CECT 7787	Produtora de ESBL (SHV-18)
<i>Staphylococcus aureus</i>	NCTC 12493	<i>mecA</i> positivo, MRSA heterorresistente
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 51299 NCTC 13379 CIP 104676 DSM 12956 CCUG 34289	Resistência de alto nível os aminoglicosídeos (HLAR) e vancomicina resistente (<i>vanB</i> positivo)
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 49247 NCTC 12699 CIP 104604 DSM 9999 CCUG 26214	β-lactamase negativo, ampicilina resistente (BLNAR)

Apêndice A

Teste de disco-difusão para *Campylobacter jejuni* e *C. coli*

A metodologia a seguir (Tabela A1) deve ser seguida quando for realizado teste de disco difusão para *Campylobacter jejuni* e *C. coli* de acordo com o EUCAST.

Tabela A1	Metodologia de disco-difusão para <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>C. coli</i>
Meio	Ágar Mueller-Hinton com 5% de sangue desfibrinado de cavalo e 20 mg/L β -NAD (MH-F) Para reduzir o <i>swarming</i> (véu), as placas de MH-F devem ser submetidas a secagem antes da inoculação (20-25°C <i>overnight</i> ou a 35°C, com a tampa removida por 15 min).
Inóculo	0,5 McFarland
Incubação	Ambiente microaeróbio 41±1°C 24 horas A incubação deve resultar em crescimento confluyente. Alguns isolados de <i>C. coli</i> podem não ter crescimento suficiente depois de 24 h Incubação. Esses isolados devem ser reincubados imediatamente e as halos devem ser lidos depois de um total de 40-48 h de incubação. A temperatura de incubação de 41±1°C foi escolhida para criar condições favoráveis de incubação para o crescimento de <i>Campylobacter</i> spp.
Leitura	As instruções de leitura do EUCAST devem ser utilizadas: Leia as placas de MH-F com a tampa removida e luz refletida. As bordas dos halos devem ser lidas no ponto de completa inibição, a olho nu, com a placa posicionada a cerca de 30 cm dos olhos.
Controle de Qualidade	Os halos de inibição de <i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33560 devem ser dentro dos limites definidos (http://www.eucast.org) e