

# **Teste sensibilidade aos antimicrobianos**

## **Método de disco-difusão EUCAST**

**Versão 6.0  
Janeiro 2017**

**Versão para  
português válida  
a partir de  
01/08/2018**



<b>Conteúdo</b>		<b>Página</b>
	<a href="#"><u>Alterações no documento</u></a>	
	<a href="#"><u>Abreviaturas e Terminologia</u></a>	
1	<a href="#"><u>Introdução</u></a>	6
2	<a href="#"><u>Preparação e armazenamento dos meios</u></a>	7
3	<a href="#"><u>Preparação do inóculo</u></a>	9
4	<a href="#"><u>Inoculação das placas de ágar</u></a>	11
5	<a href="#"><u>Aplicação dos discos de antimicrobianos</u></a>	12
6	<a href="#"><u>Incubação das placas</u></a>	13
7	<a href="#"><u>Observação das placas após incubação</u></a>	15
8	<a href="#"><u>Aferição dos halos e interpretação</u></a>	16
9	<a href="#"><u>Controle de Qualidade</u></a>	18
	<a href="#"><u>Apêndice A</u></a>	21

## Alterações no documento da versão anterior (v.5.0)

Seção	Alterações
2.2	Informação adicionada sobre as dimensões das placas de Petri
2.3	Informação adicionada sobre a secagem das placas
2.4	Modificação na recomendação de armazenamento de placas preparadas “in house”
2.7	Esclarecimento sobre a secagem das placas
Tabela 1	<i>Aerococcus sanguinicola</i> , <i>A.urinae</i> e <i>Kingella kingae</i> adicionados
3.2, 3.3	Informações adicionadas sobre o preparo do inóculo
3.3.2	Esclarecimento sobre o uso do padrão 0,5 de McFarland
3.4	Resumo da regra 15-15-15 minutos adicionada (ver nota de rodapé 1)
Tabela 2	Informação sobre o padrão de McFarland removido
4.1	Informação adicionada sobre deixar as placas alcançarem a temperatura ambiente antes da inoculação
4.3, 4.3.1, 4.3.2	Informação adicionada sobre inoculação das placas de gram-negativos e gram-positivos
4.4	Informação adicionada sobre inoculação de mais de uma placa de agar
4.5, 4.5.1	Informação adicionada sobre técnicas de semeadura
4.6	Resumo da regra 15-15-15 minutos adicionada (ver nota de rodapé 1)
5.3	Intervalo de tempo para aplicação dos discos adicionado. Resumo da regra de 15-15-15 minutos adicionada (ver nota de rodapé 1)
6.2	Informação adicionada sobre o empilhamento de placas na estufa
6.3.1	Esclarecimento sobre tempo de incubação
Tabela 3	Corrigido o intervalo de tempo para incubação prolongada de <i>Corynebacterium</i> spp.
Tabela 3	Adicionado <i>Aerococcus sanguinicola</i> e <i>A.urinae</i> e <i>Kingella kingae</i>
8.5, 8.5.1	Esclarecimento sobre leitura dos halos e uso de leitores automatizados de halos.
8.8	Informação adicionada sobre Guia de Leitura do BrCAST

<b>8.9.1</b>	Esclarecimento sobre a leitura dos halos quando existe duplo halo ou colônias isoladas dentro dos halos
<b>8.9.2</b>	Esclarecimento da leitura dos halos de sulfametoxazol-trimetoprim para <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ,
<b>8.9.3</b>	Instrução de leitura para <i>Enterobacteriaceae</i> com ampicilina-sulbactam e amoxicilina-ácido clavulânico adicionada
<b>8.9.6</b>	Instrução de leitura para benzilpenicilina atualizada
<b>8.9.10</b>	Esclarecimento sobre como diferenciar hemólise de crescimento na leitura dos halos de inibição.
<b>8.9.11</b>	Instrução para leitura dos halos de fosfomicina para <i>Escherichia coli</i> adicionada.
<b>9.1.1</b>	Informação adicionada para o controle do componente do inibidor da combinação dos discos de $\beta$ -lactâmico com inibidor de $\beta$ -lactamase,
<b>9.3</b>	Informação adicionada sobre repique das cepas controle
<b>9.4.1</b>	Informação adicionada sobre como utilizar os alvos e intervalos do EUCAST CQ
<b>9.5</b>	Mudança na recomendação da frequência do controle de qualidade
<b>Tabela 4</b>	Informação adicionada sobre as características da <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218
<b>Tabela 4</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 adicionada
<b>Tabela 4</b>	<i>Haemophilus influenzae</i> NCTC 8468 removido
<b>Tabela 5</b>	Características para <i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 49766 reformuladas

## Abreviaturas e terminologia

Abreviaturas e terminologia	
ATCC	American Type Culture Collection <a href="http://www.atcc.org">http://www.atcc.org</a>
CCUG	Culture Collection University of Göteborg <a href="http://www.ccug.se">http://www.ccug.se</a>
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo <a href="http://www.cect.org">http://www.cect.org</a>
CIP	Collection de Institute Pasteur <a href="http://www.cabri.org/CABRI/srs-doc/cip_bact.info.html">http://www.cabri.org/CABRI/srs-doc/cip_bact.info.html</a>
DSM	Culturas bacteriana do “Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)” agora com número DSM <a href="http://www.dsmz.de/">http://www.dsmz.de/</a>
ESBL	$\beta$ -lactamase de espectro estendido
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing <a href="http://www.eucast.org">http://www.eucast.org</a>
MH	Ágar Müller-Hinton
MH-F	Ágar Müller-Hinton - para microrganismos fastidiosos (MH suplementado)
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à oxacilina (metilina) [com gene <i>mecA</i> ou <i>mecC</i> ]
NCTC	National Collection of Type Cultures <a href="http://www.hpacultures.org.uk">http://www.hpacultures.org.uk</a>
$\beta$ -NAD	$\beta$ -nicotinamida-adenina-dinucleotídeo
Salina	Solução de NaCl a 0,85% em água (8,5g/L)

## 1. Introdução

O método de disco-difusão é uma das abordagens mais antigas para realização de testes de sensibilidade aos antimicrobianos 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, 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 sugerido pelo EUCAST é padronizado e 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 BrCAST-EUCAST são calibrados para os pontos de corte europeus harmonizados, que estão publicados pelo BrCAST-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](http://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 Müller Hinton (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 site <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. Nenhuma gota de água deve estar visível na superfície do ágar ou no interior da tampa. Se necessário, seque as placas a 20-25°C *overnight*, ou a 35 °C, com a tampa removida por 15 minutos. Não seque as placas excessivamente.

2.4 Armazenar as placas preparadas no laboratório a 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 (preparadas no laboratório ou comercialmente), estocadas em sacos plásticos ou em recipientes selados, pode ser necessária a secagem antes do uso (ver seção 2.3). Isto é necessário para impedir o excesso de umidade que pode resultar em halos com bordas distorcidas e/ou névoa no interior dos halos.

**Tabela 1:** Meios para realização do teste de sensibilidade aos antimicrobianos

<b>Microrganismo</b>	<b>Meio</b>
Enterobacterales	MH ágar
<i>Pseudomonas</i> spp.	MH ágar
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	MH ágar
<i>Acinetobacter</i> spp.	MH ágar
<i>Staphylococcus</i> spp.	MH ágar
<i>Enterococcus</i> spp	MH ágar
<i>Streptococcus</i> grupos A, B, C e G	MH-F ágar <sup>1</sup>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	MH-F ágar <sup>1</sup>
<i>Streptococcus</i> grupo viridans	MH-F ágar <sup>1</sup>
<i>Haemophilus influenzae</i>	MH-F ágar <sup>1</sup>
<i>Moraxella catarrhalis</i>	MH-F ágar <sup>1</sup>
<i>Listeria monocytogenes</i>	MH-F ágar <sup>1</sup>
<i>Pasteurella multocida</i>	MH-F ágar <sup>1</sup>
<i>Campylobacter jejuni</i> e <i>coli</i>	MH-F ágar <sup>1</sup>
<i>Corynebacterium</i> spp.	MH-F ágar <sup>1</sup>
<i>Aerococcus sanguinicola</i> e <i>urinae</i>	MH-F ágar <sup>1</sup>
<i>Kingella kingae</i>	MH-F ágar <sup>1</sup>
Outros fastidiosos	Pendente

<sup>1</sup> MH-F = 5% de sangue desfibrinado de cavalo + 20mg/L  $\beta$ -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 de 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 da **Tabela 1**.

3.2 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.

3.3 Ajustar a suspensão do inóculo de modo a obter turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland adicionando salina ou mais bactérias. Um inóculo mais denso pode resultar em halos menores e inóculo com menor densidade terá um efeito oposto.

3.3.1 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.

3.3.2 Alternativamente, a densidade da suspensão pode ser comparada visualmente com a turbidez do padrão 0,5 da escala de McFarland.

Para auxiliar a comparação, comparar o teste e padrão contra um fundo branco com linhas pretas.

3.3.3 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.

3.4 A suspensão deve ser utilizada de preferência em até 15 min<sup>1</sup> e obrigatoriamente até 60 min após a preparação.

<sup>1</sup>Parte da regra dos 15-15-15 minutos: use a suspensão do inóculo dentro de 15 minutos da preparação, aplique os discos dentro de 15 minutos da semeadura e incube as placas dentro de 15 minutos da aplicação do discos.

**Tabela 2 Preparação do padrão de turbidez 0,5 de McFarland**

1	Adicionar 0,5 mL de solução de $\text{BaCl}_2$ 0,048 mol/L (1,175% w/v $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) a 99,5 mL de solução 0,18 mol/L (0,36 N) de $\text{H}_2\text{SO}_4$ (1% v/v) e misturar bem.
2	Conferir a densidade óptica da suspensão em um espectrofotômetro com trajeto de luz de 1 cm e cubetas apropriadas. A absorbância em 625 nm deve estar na faixa de 0,08 a 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	Renove os padrões ou confira a absorbância após 6 meses de armazenamento

## 4. Inoculação das placas de ágar.

4.1 Garantir que as placas estejam em temperatura ambiente previamente à inoculação.

4.2 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.

4.3 Mergulhar um swab de algodão estéril na suspensão

4.3.1 Para evitar a inoculação excessiva das placas de microrganismos gram-negativos, remova o excesso de líquido pressionando e girando o swab contra a parte interna do tubo acima do nível da suspensão.

4.3.2 Para bactérias gram-positivas, não pressione o swab contra a parte interna do tubo.

4.4 Quando inocular várias placas com a mesma suspensão do inóculo, repita o procedimento do item 4.3 para cada placa de ágar.

4.5 As placas podem ser inoculadas tanto espalhando o inóculo uniformemente em três direções como por um inoculador automatizado. Espalhar o inóculo uniformemente sobre toda a superfície assegurando que não haja falhas.

4.5.1 Para bactérias gram-positivas, tenha atenção especial a fim de garantir que não exista diferença na semeadura.

4.6 Aplicar os discos em até 15 min<sup>1</sup> 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.

<sup>1</sup>Parte da regra dos 15-15-15 minutos: use a suspensão do inóculo dentro de 15 minutos da

preparação, aplique os discos dentro de 15 minutos da semeadura e incube as placas dentro de 15 minutos da aplicação do discos

## 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 Permitir que os discos alcancem a temperatura ambiente antes da abertura dos cartuchos ou recipientes utilizados para o armazenamento dos discos. Isto previne a condensação, que leva a rápida deterioração de alguns agentes.

5.3 Aplicar os discos firmemente na superfície da placa de ágar dentro de 15 minutos da inoculação. O contato dos discos com a superfície do 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.

5.4 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.

5.4.1 Para detecção da resistência induzível à clindamicina em estafilococos e estreptococos, os discos de eritromicina e clindamicina devem ser posicionados em uma distância de 12 a 20 mm borda a borda para os estafilococos e 12 a 16 mm para estreptococos.

5.5 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:

5.5.1 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, freezer com porta de vidro e iluminação interna!

5.5.2 Armazenar os discos em estoque de acordo com as instruções do fabricante. Alguns agentes são mais sensíveis que outros (como, por exemplo, amoxicilina-ácido clavulânico, cefaclor e carbapenens) e existem recomendações específicas dos fabricantes.

5.5.3 Armazenar os discos em uso de acordo com as instruções do fabricante. Uma vez os recipientes abertos, os discos devem ser utilizados dentro da data de validade estabelecida pelo fabricante.

5.5.4 Descartar os discos na data de expiração indicada na embalagem.

5.5.5 Realizar frequentemente o controle de qualidade (ver Seção 9) dos insumos em uso para garantir que os discos antimicrobianos não perderam a potência durante o armazenamento.

## 6. Incubação das placas

6.1 Inverter as placas e assegurar que os discos não caiam na superfície do ágar. 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 pode alterar 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**.

6.3.1 Incubação além do limite de tempo recomendado não é permitido uma vez que resulta no crescimento dentro do halo de inibição e reporte de isolados falso-resistentes.

6.3.2 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.

<sup>1</sup>Parte da regra dos 15-15-15 minutos: use a suspensão do inóculo dentro de 15 minutos de preparação, aplique os discos dentro de 15 minutos da semeadura e incube as placas dentro de 15 minutos da aplicação do discos



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

<b>Microrganismo</b>	<b>Condições de incubação</b>
<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 (24 h para glicopeptídeos)
<i>Streptococcus</i> spp. grupos A, B, C e G	35±1°C em ar com 4-6% de CO <sub>2</sub> por 16-20 h
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	35±1°C em ar com 4-6% de CO <sub>2</sub> por 16-20 h
Estreptococos do grupo <i>viridans</i>	35±1°C em ar com 4-6% de CO <sub>2</sub> por 16-20 h
<i>Haemophilus influenzae</i>	35±1°C em ar com 4-6% de CO <sub>2</sub> por 16-20 h
<i>Moraxella catarrhalis</i>	35±1°C em ar com 4-6% de CO <sub>2</sub> por 16-20 h
<i>Listeria monocytogenes</i>	35±1°C em ar com 4-6% de CO <sub>2</sub> por 16-20 h
<i>Pasteurella multocida</i>	35±1°C em ar com 4-6% de CO <sub>2</sub> por 16-20 h
<i>Campylobacter jejuni</i> , <i>C. coli</i>	Ver <b>apêndice A</b>
<i>Corynebacterium</i> spp.	35±1°C em ar com 4-6% de CO <sub>2</sub> 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 40-44 h de incubação
<i>Aerococcus sanguinicola</i> e <i>urinae</i>	35±1°C em ar com 4-6% de CO <sub>2</sub> 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 40-44 h de incubação
<i>Kingella kingae</i>	35±1°C em ar com 4-6% de CO <sub>2</sub> 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 40-44 h de incubação
Outros microrganismos fastidiosos	Pendente

## 7. Observação das placas após incubação

7.1 Um inóculo correto e placas satisfatoriamente semeadas devem resultar em crescimento confluyente.

7.1.1 Quando forem observadas colônias isoladas, o inóculo é muito escasso e o teste deve ser repetido.

7.2 O crescimento deve ser uniformemente distribuído na superfície do ágar para obter halos de inibição uniformemente circulares (não distorcidos)

7.3 Verificar se os diâmetros dos halos de inibição das cepas de controle de qualidade estão dentro dos limites aceitáveis. (<http://www.eucast.org>). A versão desses documentos em Português está disponível no site do BrCAST ([brcast.org.br](http://brcast.org.br))

## 8. Aferição e interpretação dos diâmetros dos halos de inibição

8.1 Para todos os antimicrobianos (exceto para aqueles citados na seção 8.90), 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 Müller-Hinton** não suplementadas pelo seu fundo, com luz refletida contra um fundo escuro.

8.3 Ler as placas **de ágar Müller-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 seção 8.9).

8.5 Aferir os diâmetros dos halos de inibição em milímetros com uma régua **calibrada** ou paquímetro.

8.5.1 Se um leitor automatizado for utilizado, ele deve ser calibrado com a leitura manual.

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 modelo 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 modelos padrões está disponível livremente no: <http://bsac.org.uk/susceptibility/template-program>.

8.8 Vários exemplos de figuras mostrando leitura dos diâmetros dos halos de inibição estão disponíveis no Guia de leitura em <http://www.eucast.org>. Estes documentos também incluem instruções de leitura para combinações específicas de microrganismo-agente antimicrobiano.

#### 8.9 Instruções específicas de leitura:

8.9.1 Em caso de halo duplo ou colônias isoladas dentro do halo de inibição verificar a pureza e repetir o teste, se necessário. Se a cultura estiver pura, as colônias dentro do halo devem ser consideradas.

8.9.2 Para sulfametoxazol-trimetoprim ou trimetoprim, pode aparecer um crescimento reduzido dentro do halo de inibição até o disco devido à presença de antagonistas no meio. 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 no site do BrCAST ([brcast.org.br](http://brcast.org.br)).**

8.9.3 Para *Enterobacteriaceae*, ao testar ampicilina, ampicilina-sulbactam e amoxicilina-ácido clavulânico ignorar o crescimento que possa aparecer como uma fina película produzida no interior do halo em alguns lotes de ágar Müller-Hinton.

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

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

crescimento.

8.9.6 Para *Staphylococcus aureus*, 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.**

8.9.7 Quando a cefoxitina for utilizada para detecção da resistência à oxacilina (metecilina) em *Staphylococcus aureus*, aferir o halo evidente e examinar os halos de inibição cuidadosamente contra a luz para detectar colônias dentro do halo. Isto pode ser devido a presença de mais de um microrganismo ou expressão de resistência heterogênea à oxacilina (metecilina).

8.9.8 Ler os testes de sensibilidade de linezolid a partir do fundo da placa, com a placa contra a luz (luz transmitida).

8.9.9 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 melhor investigadas. Isolados não podem ser reportados sensíveis antes de 24 horas de incubação. **Ver recomendações na Tabela de Pontos de Corte Clínicos.**

8.9.10 Para estreptococos hemolíticos, ler a inibição de crescimento e não da hemólise. A  $\beta$ -Hemólise é usualmente livre de crescimento, enquanto  $\alpha$ -hemólise e o crescimento geralmente coincidem. Inclinare a placa para frente e para trás para melhor diferenciar hemólise de crescimento.

8.9.11 Para *Escherichia coli* e fosfomicina, não considere colônias isoladas dentro do halo de inibição e efetuar a leitura na borda externa do halo.

## 9. Controle de Qualidade

9.1 Utilizar as cepas controle especificadas (**Tabela 4**) para monitorar o desempenho do teste. As principais cepas controle recomendadas são cepas tipicamente sensíveis, mas cepas resistentes (**isolados-desafio**) 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 ou através de fontes comerciais (**Atenção: as cepas controle devem ser adquiridas preferencialmente até a 4ª geração**).

9.1.1 Para o controle dos componentes inibidores nos discos combinados de  $\beta$ -lactâmico-inibidor de  $\beta$ -lactamase, é recomendado utilizar cepas produtoras de  $\beta$ -lactamases específicas (**Tabela 4**). Estas devem fazer parte da rotina do controle de qualidade. O componente ativo é avaliado com uma cepa sensível do Controle de Qualidade.

9.2 **A ativação das cepas controles deve seguir as recomendações do fornecedor, realizar o maior número possível de tubos contendo a cepa controle (Sugestão: preparar 15 criotubos, suficientes para utilizar 1 tubo por mês e os demais para serem utilizados nos anos subsequentes durante o período de validade estabelecido pelo laboratório e conforme a geração e temperatura de armazenamento)**. Sugere-se armazenar as cepas controle em condições que mantenham a viabilidade e característica dos microrganismos. O armazenamento em **miçangas** com caldo glicerol a  $-70^{\circ}\text{C}$  (**caldo TSB com glicerol a 10 a 15%, solução de leite desnatado 10-20% ou equivalente comercial**) é um método conveniente. Microrganismos não fastidiosos podem ser armazenados a temperatura inferior ou igual a  $-20^{\circ}\text{C}$ . 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 **Mensalmente (ou semanalmente) retirar um criotubo do freezer e**

subcultivar uma miçanga ou alíquota em meio não seletivo apropriado e verificar a pureza. Desta cultura pura, preparar um subcultivo a cada dia de teste. Para microrganismos fastidiosos que não sobrevivem na placa por 5 a 6 dias, se necessário, subcultivar com maior frequência e, por não mais do que uma semana.

Quando subcultivar uma cepa controle, utilize várias colônias para evitar a seleção de mutantes.

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>).

9.4.1 Nas tabelas de controle de qualidade do BrCAST-EUCAST, são listados tanto o intervalo esperado quanto o valor do alvo. A repetição dos testes das cepas de controle de qualidade do BrCAST-EUCAST devem fornecer valores de halos de inibição randomicamente distribuídos dentro do intervalo recomendado. Se o número de testes for  $\geq 10$ , a média dos halos de inibição deve ser próxima do valor alvo ( $\pm 1$  mm).

9.5 Utilizar as cepas recomendadas para o controle de qualidade de rotina para monitorar o desempenho dos testes. Os testes controle devem ser realizados e verificados semanalmente para os antibióticos que fazem parte dos testes de rotina. A cada dia que os testes forem realizados, além de verificar o intervalo daquele resultado, verificar os resultados de pelo menos 20 testes consecutivos progressos. Verificar os resultados quanto à ocorrência de tendência ou diâmetros de halos consistentemente acima ou abaixo do alvo. As cepas de controle de qualidade devem mostrar desempenho satisfatório (não mais que 1 em 20 testes fora dos limites estabelecidos). Caso 2 ou mais testes estejam fora do intervalo aceitável, é necessária uma investigação.

Para facilitar a análise dos resultados de CQ recomendamos o uso do gráfico de



Levey-Jennings disponível no site [www.brkast.org.br](http://www.brkast.org.br).

9.6 Em adição com o CQ de rotina, testar cada novo lote **ou remessa** de ágar Müller-Hinton **ou de discos de sensibilidade**, para garantir que os halos estejam dentro dos limites aceitáveis.

Aminoglicosídeos podem evidenciar variação inaceitável de cátions divalentes no meio; tigeciclina pode evidenciar variação no magnésio; sulfametoxazol-trimetoprim apresentará problemas com o conteúdo de timina e eritromicina pode evidenciar pH fora do aceitável.

**9.7 Ao analisar problemas de controle de qualidade deve-se considerar que problemas com o ágar Müller-Hinton usualmente afetam toda uma classe de antimicrobianos, enquanto problemas com a potência do disco restringem-se ao disco em questão. Abaixo se encontram alguns pontos a serem observados caso o controle de qualidade não apresente resultados esperados.**

**9.8 Ao iniciar um programa de CQ, ou sempre que houver mudança na potência do disco, formulação ou fabricante de insumos (meios de cultura e/ou discos), mudança no preparo do inóculo ou mesmo adição de um novo antimicrobiano, deve-se realizar a verificação/validação deste procedimento.**

**9.8.1 A verificação/validação requer a realização de 20 testes com as mesmas combinações de cada uma das cepas controle e discos de antimicrobianos. Os testes podem ser realizados em cinco replicatas, ou seja, devem ser preparadas cinco suspensões distintas de cada cepa controle, sendo que todo o procedimento deve ser realizado de forma independente, durante quatro dias consecutivos. A análise dos resultados deve ser realizada conforme os critérios a seguir (ver **Figura 1**):**

**a. Desempenho satisfatório: não mais que 1 em 20 testes fora dos limites aceitáveis para que se passe para o CQ semanal.**

- b. Caso 2 testes estejam fora do intervalo aceitável, recomenda-se a realização de 10 testes adicionais (5 replicatas em 2 dias consecutivos), nos quais todos os resultados devem estar dentro do intervalo aceitável para que se passe ao CQ semanal.
- c. Caso 1 ou mais resultados dentre os 10 testes adicionais ou 3 ou mais resultados dentre os 20 testes iniciais apresentarem-se fora do intervalo aceitável, uma investigação deve ser iniciada.

#### 9.8.2 Passos básicos para investigação de erros no método de disco-difusão:

Nota: Sugestões de investigação podem ser encontradas no documento **Anexo 1**.

- a. Verificar se foi utilizada a cepa controle correta e sua pureza. Verificar se a cepa controle foi armazenada nas condições e tempos recomendados.
- b. Verificar a densidade do inóculo, principalmente quando preparado manualmente. Recomenda-se utilizar sempre uma escala padrão ou utilizar um turbidímetro para preparar os testes. Inóculos com turbidez acima do ideal resultam em diâmetros de halos de inibição abaixo dos limites estabelecidos, assim como inóculos com turbidez abaixo do ideal resultam em diâmetros de halos de inibição acima dos limites estabelecidos. Deve-se suspeitar deste problema caso vários antimicrobianos apresentem o mesmo problema.
- c. Com relação ao ágar Müeller-Hinton, verificar:  
Nota: Em caso de meios de cultura adquiridos comercialmente, comunicar o fabricante.

- Espessura da placa de ágar Müller-Hinton, utilizando bisturi ou estilete. Realizar a secção transversal no centro da placa. Aferir a espessura do ágar, que deve ser de  $4,0 \pm 0,5$  mm. Espessuras menores do que 3,5 mm resultam em diâmetros de halos de inibição acima dos limites estabelecidos, assim como espessuras acima de 4,5 mm resultam em diâmetros de halos de inibição abaixo dos limites estabelecidos. Deve-se suspeitar deste problema caso vários antimicrobianos apresentem o mesmo erro.

- pH do ágar Müller-Hinton. Utilizar eletrodo de superfície e aferir o pH que deve ser de  $7,3 \pm 0,2$ . Valores abaixo do limite estabelecido resultam em diâmetros de halos de inibição diminuídos para aminoglicosídeos (amicacina, gentamicina, tobramicina), clindamicina e macrolídeos (eritromicina e claritromicina), mas diâmetros de halo aumentados para tetraciclina. Valores de pH acima do limite estabelecido tem efeito inverso àquele observado para a redução do pH. Deve-se suspeitar deste problema caso dois ou mais antimicrobianos da mesma classe apresentem o mesmo problema.

- Halos reduzidos para combinações de  $\beta$ -lactâmicos-inibidores com  $\beta$ -lactamases frente à cepa *E. coli* ATCC 35218 ou *K. pneumoniae* ATCC 700603 indicam degradação do componente inibidor e usualmente resultam de acúmulo de umidade resultante de acondicionamento sem sílica ou abertura do recipiente sem que tenham atingido a temperatura ambiente. Halos aumentados podem indicar acondicionamento das cepas em temperatura de armazenamento acima da recomendada.

### 9.8.3 Quando houver mudança nos critérios para interpretação das

categorias, não há necessidade de realizar nova verificação/validação.

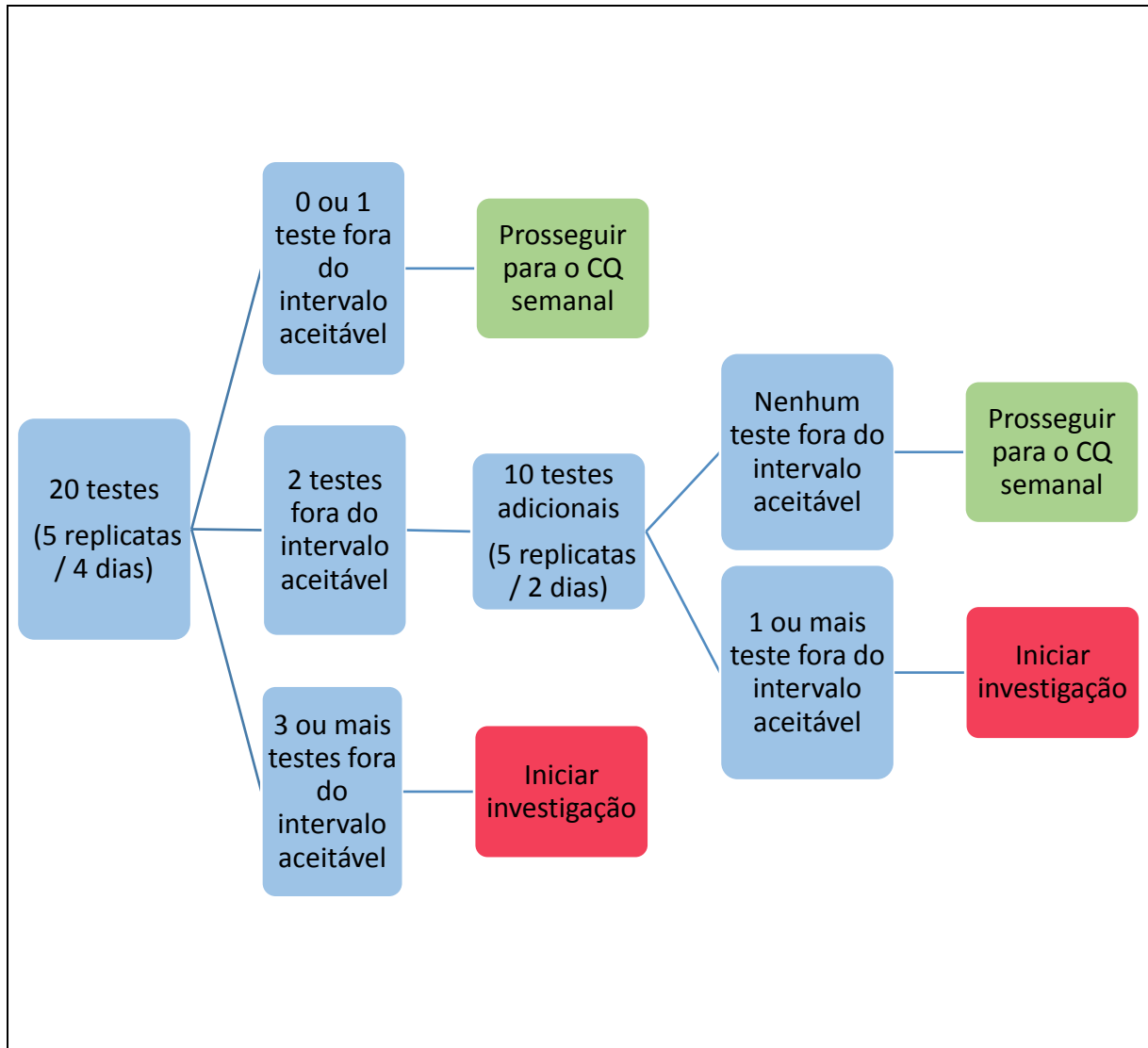


Figura 1. Fluxograma para validação do teste de sensibilidade.

**Tabela 4:** Cepas para controle de qualidade de rotina

<b>Microrganismo</b>	<b>Cepa</b>	<b>Características</b>
<i>Escherichia coli</i>	<b>ATCC 25922</b> NCTC 12241 CIP 7624 DSM 1103 CCUG 17620 CECT 434	<b>Sensível, selvagem</b>
<i>Escherichia coli</i>	<b>ATCC 35218</b> NCTC 11954 CIP 102181 DSM 5564 CCUG 30600 CECT 943	<b>β-lactamase TEM-1 , resistente à ampicilina</b> (para controle do componente inibidor de discos combinados de β-lactâmico-inibidor de β-lactamase)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<b>ATCC 700603</b> NCTC 13368 CCUG 45421 CECT 7787	<b>Produtor de β-lactamase (SHV-18)</b> (para controle do componente inibidor de discos combinados de β-lactâmico-inibidor de β-lactamase)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<b>ATCC 27853</b> NCTC 12934 CIP 76110 DSM 1117 CCUG 17619 CECT 108	<b>Sensível, selvagem</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<b>ATCC 29213</b> NCTC 12973 CIP 103429 DSM 2569 CCUG 15915 CECT 794	<b>Fraco produtor de β-lactamase</b>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<b>ATCC 29212</b> NCTC 12697 CIP 103214 DSM 2570 CCUG 9997 CECT 795	<b>Sensível, selvagem</b>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<b>ATCC 49619</b> NCTC 12977 CIP 104340 DSM 11967 CCUG 33638	<b>Sensibilidade reduzida à benzilpenicilina</b>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<b>ATCC 49766</b> NCTC 12975 CIP 103570 DSM 11970 CCUG 29539	<b>Sensível, selvagem</b>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<b>ATCC 33560</b> NCTC 11351 CIP 702 DSM 4688, CCUG 11284	<b>Sensível, selvagem</b> Ver Apêndice A para condições de teste



**Tabela 5:** Cepas controle para detecção de mecanismos específicos de resistência (CQ estendido)

<b>Microrganismo</b>	<b>Cepa</b>	<b>Características</b>
<b><i>Klebsiella pneumoniae</i></b>	<b>ATCC 700603</b> NCTC 13368 CCUG 45421 CECT 7787	Produtora de ESBL (SHV-18)
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	<b>NCTC 12493</b>	<i>mecA</i> positivo, MRSA heterorresistente
<b><i>Enterococcus faecalis</i></b>	<b>ATCC 51299</b> NCTC 13379 CIP 104676 DSM 12956 CCUG 34289	Resistência de alto nível os aminoglicosídeos (HLAR) e vancomicina resistente ( <i>vanB</i> positivo)
<b><i>Haemophilus influenzae</i></b>	<b>ATCC 49247</b> NCTC 12699 CIP 104604 DSM 9999 CCUG 26214	$\beta$ -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.

<b>Tabela A1: Metodologia de disco-difusão para <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>C. coli</i></b>	
<b>Meio</b>	Ágar Müeller-Hinton com 5% de sangue desfibrinado de cavalo e 20 mg/L β-NAD (MH-F) Para reduzir o véu ( <i>swarming</i> ), 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).
<b>Inóculo</b>	0,5 McFarland Ambiente micro aeróbio 41±1°C 24 horas
<b>Incubação</b>	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.
<b>Leitura</b>	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.
<b>Controle de Qualidade</b>	Os halos de inibição de <i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33560 devem ser dentro dos limites definidos ( <a href="http://www.eucast.org">http://www.eucast.org</a> ) e <a href="http://www.brcast.org.br">www.brcast.org.br</a>



## ANEXO 1

### Controle de qualidade disco-difusão – sugestões para investigação:

#### 1. Realizar 20 testes consecutivos (4 quintuplicatas), sempre que houver:

- Mudança de metodologia
- Mudança de método de leitura para preparo do inóculo de visual para fotométrico ou vice-versa
- Conversão de leitura manual para automatizada
- Novo antibiótico ou novo painel com concentração diferente das drogas

#### Caso dois ou mais resultados estejam fora do intervalo (combinação droga X microrganismo) considerar:

- Contaminação
- Teste com a cepa incorreta
- Disco incorreto
- Condições da prova incorretas (tempo de incubação, atmosfera)
- Inóculo

#### Conduta: Realizar mais 10 testes (2 quintuplicatas)

Se estiver OK, voltar à rotina semanal

Se não estiver OK (erros não óbvios): seguir a investigação

#### Lista de Verificação p/ Ações Corretivas:

- Zonas de inibição ou CIM foram medidas corretamente?
- Escala de McFarland homogênea e dentro da validade?
- Suspensão do inóculo foi preparada adequadamente?
- Os materiais estão armazenados adequadamente?
- Os materiais estão dentro da data de validade?
- O meio Müeller Hinton apresenta espessura e condições satisfatórias no CQ da origem?
- A temperatura da estufa e atmosfera estão adequadas?

- O técnico é qualificado?

### **Erros Sistemáticos (Problemas no Sistema de Controle de Qualidade)**

- Os resultados podem estar fora do intervalo por um problema na metodologia

- Podem envolver múltiplos componentes do sistema

- Podem levar a resultados errôneos de pacientes se não corrigidos

- As ações corretivas devem ser realizadas imediatamente e documentadas

### **Exemplos de erros sistemáticos**

- Um único antibiótico está fora do intervalo em mais de uma cepa do CQ

- Um único antibiótico está fora do intervalo por mais de um dia de prova

- Vários antibióticos fora do intervalo (excluindo-se possível troca de cepa)

### **Ações corretivas / Resultados de Pacientes:**

- Revisar retrospectivamente os resultados dos testes de sensibilidade dos pacientes desde a última vez que se obteve resultados de CQ aceitáveis.

- Realizar novamente as provas dos isolados dos pacientes, se necessário e possível.

- Se necessário, enviar os resultados corrigidos e avisar os médicos se os resultados forem clinicamente relevantes.