

Como Implantar o BrCAST na Rotina Laboratorial Como fica Controle de Qualidade DD



Marinês Dalla Valle Martino

Representante da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica no BrCAST

Lista de verificação para facilitar a
implementação
dos testes de sensibilidade aos
antimicrobianos com os pontos de corte
do EUCAST

ESCOLHER UM LÍDER



- Identificar métodos de TSA no laboratório
- Certificar-se que estão adequados com os pontos de corte do EUCAST

Tabela 1 – Discos recomendados pelo EUCAST e com conteúdo distinto daquele recomendado pelo CLSI

Antimicrobiano	Microrganismo	Conteúdo do Disco - EUCAST	Conteúdo do Disco - CLSI
Amoxicilina-ácido clavulânico	<i>Haemophilus</i> spp. e <i>Moraxella catharralis</i>	2-1 µg	20-10 µg
Ampicilina	Todos para os quais o teste está indicado, EXCETO ao testar <i>Enterobacteriaceae</i> , quando é utilizado o disco de 10 µg	2 µg	10 µg
Cefotaxima	Todos para os quais o teste está indicado	5 µg	30 µg
Ceftarolina	Todos para os quais o teste está indicado	5 µg	30 µg
Ceftazidima	Todos para os quais o teste está indicado	10 µg	30 µg
Gentamicina	<i>Enterococcus</i>	30 µg	120 µg
Nitrofurantoína	Todos para os quais o teste está indicado	100 µg	300 µg
Penicilina	Todos para os quais o teste está indicado	1 U	10 U
Piperacilina-tazobactam	Todos para os quais o teste está indicado	30-6 µg	100-10 µg
Vancomicina	Todos para os quais o teste está indicado	5 µg	30 µg

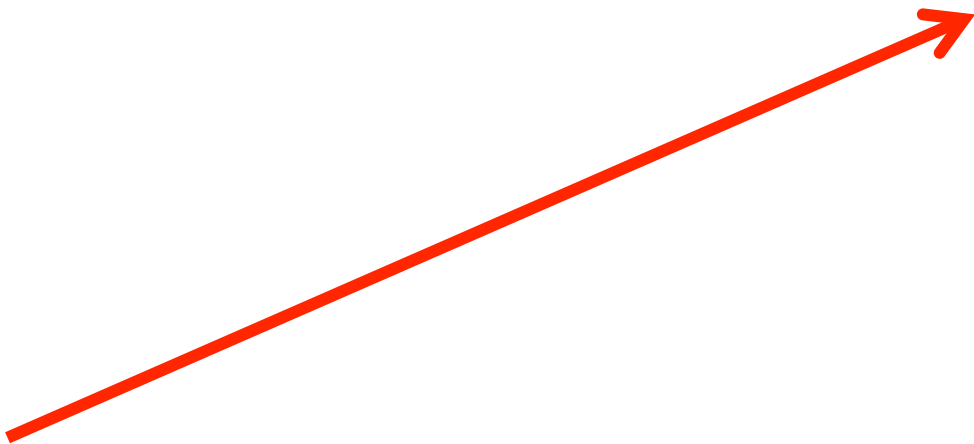
Tabela 1 – Discos recomendados pelo EUCAST e com conteúdo distinto daquele recomendado pelo CLSI

Antimicrobiano	Microrganismo	Conteúdo do Disco - EUCAST	Conteúdo do Disco - CLSI
Amoxicilina-ácido clavulânico	<i>Haemophilus</i> spp. e <i>Moraxella catharralis</i>	2-1 µg	20-10 µg
Ampicilina	Todos para os quais o teste está indicado, EXCETO ao testar <i>Enterobacteriaceae</i> , quando é utilizado o disco de 10 µg	2 µg	10 µg
Cefotaxima	Todos para os quais o teste está indicado	5 µg	30 µg
Ceftazidima	Todos para os quais o teste está indicado	5 µg	30 µg
Gentamicina	<i>Enterococcus</i>	10 µg	30 µg
Nitrofurantoína	Todos para os quais o teste está indicado	30 µg	120 µg
Penicilina	Todos para os quais o teste está indicado	100 µg	300 µg
Piperacilina-tazobactam	Todos para os quais o teste está indicado	1 U	10 U
Vancomicina	Todos para os quais o teste está indicado	30-6 µg	100-10 µg
		5 µg	30 µg

- Identificar Sistemas de Apoio que possam ser afetados:
- Manuais
- Sistemas de Informação

- Identificar e Notificar:
 - Clientes
 - Usuários
 - SCIH
 - Fornecedores/Distribuidores
-
- Programar Compra e Estoque de Insumos

Informar aos organizadores dos programas de controle de qualidade externo.



Microbiology Checklist

CAP Accreditation Program



SBAC

*Sociedade Brasileira
de Análises Clínicas*



SBPC/ML

ISO 9001

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA
CLÍNICA / MEDICINA LABORATORIAL



Organização Nacional de Acreditação



BrCAST

Brazilian Committee on
Antimicrobial Susceptibility Testing

Microbiology and Quality Control

- Since May 2004 Microbiology QC obligations were met with CLSI references
- October 31, 2014 CMS memorandum:

CLSI document references will be removed from the upcoming revision of survey procedures and interpretive guidelines (IGs) for laboratories
- Why did this happen?
 - CMS removed mention of CLSI documents from its interpretive guidelines for QC because government agencies, cannot make private guidelines regulatory in effect unless those guidelines are available for free
- What now for labs? 2 options for CLIA QC compliance:
 - *Follow all applicable CLIA QC regulations*
 - OR
 - *Implement IQCP*

Microbiology Checklist

CAP Accreditation Program



MIC.21930 Susceptibility Test Endpoint Determination

Phase II

For antimicrobial susceptibility testing systems, there are written criteria for measuring and determining the MIC endpoint or zone size.

NOTE: The laboratory may use CLSI criteria, but the use of other validated criteria, such as the FDA or European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) is acceptable.

REFERENCES

- 1) Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard 12th ed.* CLSI Document M02-A12. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA; 2015.
- 2) Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement.* CLSI Document M100-S25. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA; 2015.
- 3) Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard 10th ed.* CLSI Document M07-A10. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA; 2015.
- 4) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard—Eighth Edition.* CLSI document M11-A8 (ISBN 1-56238-626-3). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2012.

Estabelecer um programa educacional por 3-6 meses dentro do laboratório com uma data pré-determinada para a implementação.

Guia de leitura

1

Método de disco-difusão para teste de sensibilidade aos
antimicrobianos do EUCAST

Versão 4.0

Junho 2014



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

REVER PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO

O método de disco-difusão do EUCAST baseia-se em um inóculo (McFarland 0,5) que permitirá crescimento confluyente em ágar Mueller-Hinton, com ou sem 5% de sangue desfibrinado de cavalo e 20 mg / L de β -NAD. É importante seguir a descrição do método (disponível em www.eucast.org). O documento traduzido para o Português está disponível no link (www.brcast.org.br).

- **A suspensão de inóculo deve ter turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland**, de preferência ajustada em dispositivo de medição fotométrica. Exceção: *Streptococcus pneumoniae* (McFarland 0,5 para cultura obtida em placa de ágar de sangue e McFarland 1,0 para cultura obtida em placa de ágar de chocolate).
- **O crescimento deve estar confluyente e uniformemente espalhado sobre o ágar.**

Aderir à regra 15-15-15 minutos para obter resultados reprodutíveis:

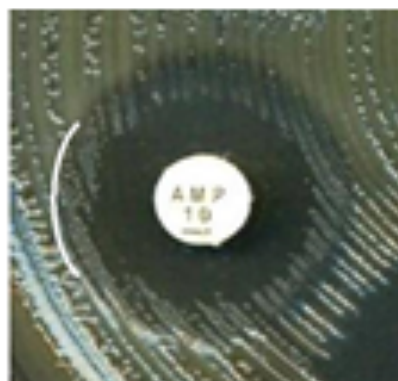
- 1- Usar o inóculo em até 15 minutos após a preparação.
- 2- Aplicar os discos em até 15 minutos após a inoculação das placas.
- 3- Iniciar a incubação em até 15 minutos após a aplicação dos discos.

Para implementação de DD

- Regra 15X15x15.
- Incubação:tempo,
- atmosfera
- e temperatura
- Inóculo inadequado.
- Condições de leitura:delimitação das bordas.

Enterobacteriaceae e ampicilina

- Ignorar o crescimento que pode aparecer como um halo interno em alguns lotes de ágar Mueller-Hinton. Este crescimento não é visto em alguns lotes de ágar e quando o halo exterior é lido não existe nenhuma diferença entre os lotes



Halo de inibição com bordas difusas/mal definidas *S. pneumoniae*

- As pequenas colônias que são visíveis quando a placa está posicionada a cerca de 30 cm do olho nu devem ser consideradas quando se faz a leitura do halo de inibição.
- A presença de pequenas colônias próximas à borda do halo de inibição pode estar relacionada ao excesso de umidade no meio MH-F, que pode ser reduzida com a secagem das placas antes do uso.

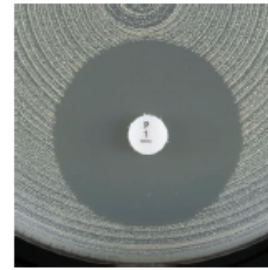
11



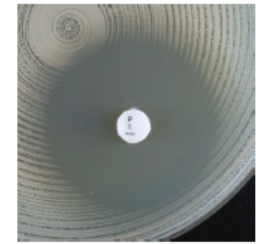
Leitura do halo de inibição com bordas difusas/mal definidas para *S. pneumoniae*.

Swarming

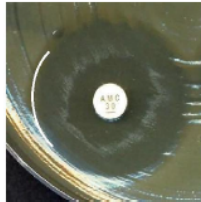
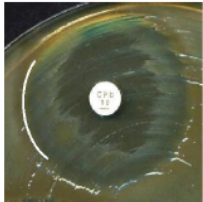
Ler a inibição do crescimento ignorando o *swarming* (observado mais frequentemente com *Proteus* spp).



S. aureus com bordas de halo de inibição bem definidas e diâmetro de halo de inibição ≥ 26 mm = Resistente



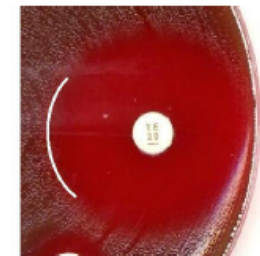
S. aureus com bordas de halo de inibição mal definidas/difusas E diâmetro do halo de inibição ≥ 26 mm = Sensível



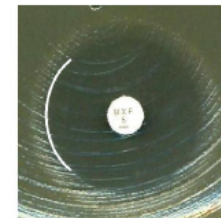
Usualmente há crescimento em toda a área de α -hemólise.



Para alguns organismos, há uma α -hemólise adicional sem crescimento. Inclinar a placa para diferenciar hemólise de crescimento!



Leitura do halo de inibição com bordas difusas/mal definidas para *S. pneumoniae*.



Leitura do halo de inibição com bordas difusas / mal definidas em para *Enterobacteriaceae*.

- Não encurtar ou prolongar o tempo de incubação (16-20 h), exceto quando expressamente indicado nas tabelas, a exemplo de *Corynebacterium*.
- Seguir as instruções para a leitura.

**Teste sensibilidade aos
antimicrobianos
Método de disco-difusão
EUCAST**

Versão 5.0
Janeiro
2015



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

SubComitê de Controle de Qualidade

André Mário Doi
Antonia Maria Machado
Cássia Maria Zoccoli
Cecilia Carvalhaes
Cristina Garcia
Jorge Sampaio
Maria Rita Elmor Araújo
Marinês Dalla Valle Martino

SubComitê de Controle de Qualidade

Representação:
Público/Privado/Universitário
Diferentes regiões
Laboratórios peq, médio e grande porte

André Mário Doi
Antonia Maria Machado
Cássia Maria Zoccoli
Cecilia Carvalhaes
Cristina Garcia
Jorge Sampaio
Maria Rita Elmor Araújo
Marinês Dalla Valle Martino

**Teste sensibilidade aos
antimicrobianos**

**Método de disco-difusão
EUCAST**

Versão 5.0
Janeiro
2015



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

**Teste sensibilidade aos
antimicrobianos**

**Método de disco-difusão
EUCAST**

VERSÃO 6.0



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

Inóculos diferentes

20 testes

(5 replicatas / 4 dias)

20 testes
(5 replicatas / 4 dias)

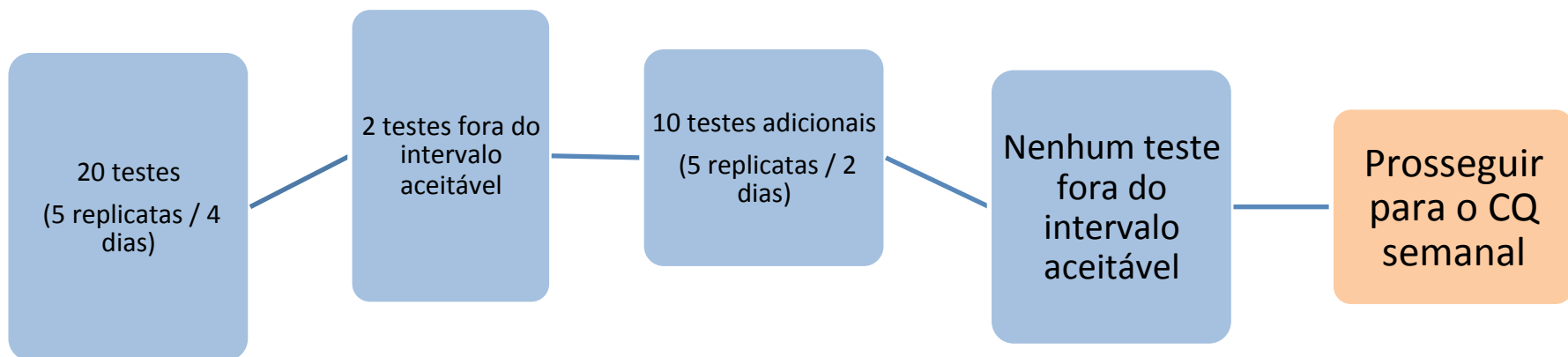
0 ou 1 teste
fora do
intervalo
aceitável

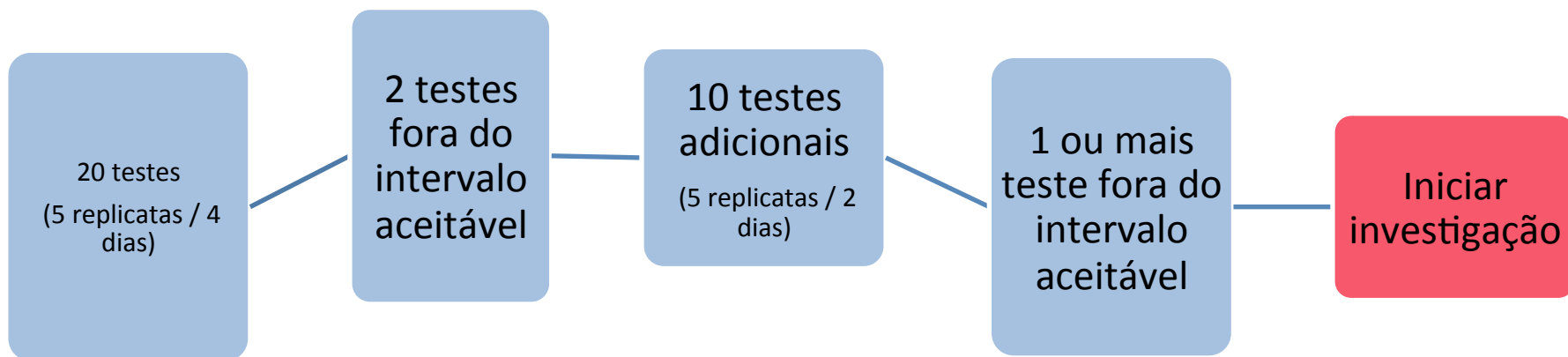
Prosseguir para o CQ
semanal

20 testes
(5 replicatas /
4 dias)

2 testes fora do
intervalo aceitável

10 testes adicionais
(5 replicatas / 2 dias)





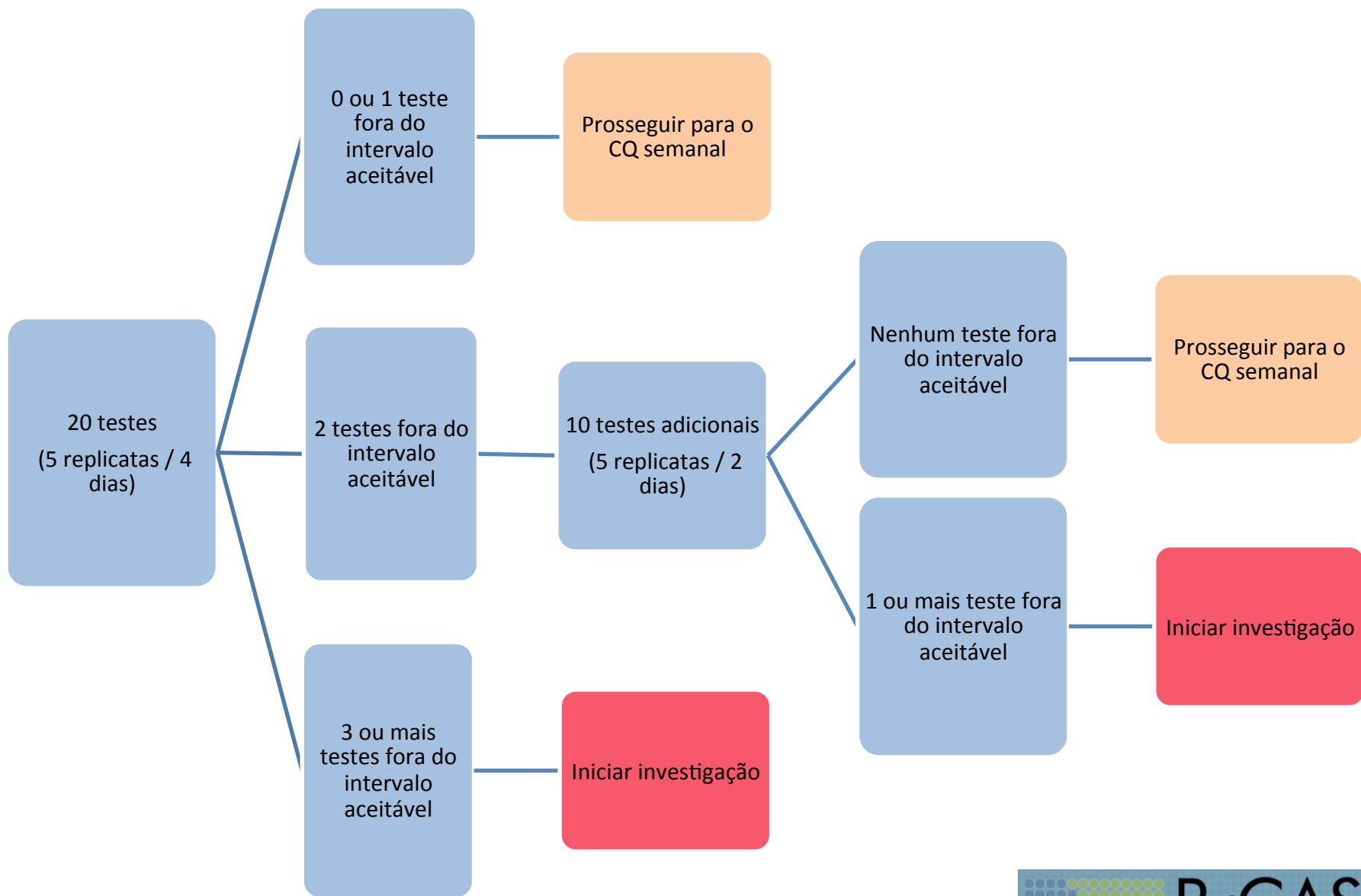
Preparações
distintas



20 testes
(5 replicatas / 4
dias)

3 ou mais testes
fora do intervalo
aceitável

Iniciar investigação



Problemas CQ

- Meio
- Disco
- Inóculo

Aplicabilidade deste CQ

- Mudanças:
- **-potência do disco**
- -formulação ou fabricante de insumo
- mudança no preparo do inóculo
- adição de novo antimicrobiano

- Os testes com as cepas de controle de qualidade devem gerar valores individuais diâmetro do halo de inibição randomicamente distribuídos dentro dos limites recomendados. Caso o número de resultados seja ≥ 10 , a média dos halos de inibição deve ser próximo ao valor-alvo.



+/- 1mm



Controle de qualidade interno de rotina e estendido para
determinação de concentração inibitória mínima e para disco-
difusão como recomendado pelo EUCAST



**Brazilian Committee on
Antimicrobial Susceptibility Testing**

Versão para Português a partir da versão 6.0 do EUCAST
Válida a partir de 01/03/2016

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
	NCTC 11351	Ver Apêndice A para condições de teste
	CIP 702	
	DSM 4688	
	CCUG 11284	

Cepas para CQ

21

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)

Método de Disco-difusão: Ágar Mueller-Hinton, McFarland 0,5, ar, 35±1°C, 18±2h. Leia o limite do halo como o ponto evidenciando ausência de crescimento, visto do fundo da placa contra um fundo escuro, sob luz refletida.

	CIM (mg/L)		Conteúdo do disco (µg)	Diâmetro do halo de inibição	
	Alvo ¹	Intervalo ²		Alvo ¹	Intervalo ³
Amikacina	1-2	0,5-4	30	22-23	19-26
Amoxicilina	4	2-8	-	-	-
Amoxicilina-ácido clavulânico ^{4,5}	4	2-8	20-10	21	18-24 ⁶
Ampicilina	4	2-8	10	18-19	15-22 ⁸
Ampicilina-sulbactam ^{6,7}	2	1-4	10-10	21-22	19-24 ⁹
Aztreonam	0,125	0,06-0,25	30	32	28-36
Cefadroxila	-	-	30	17	14-20
Cefalexina	8	4-16	30	18	15-21
Cefepima	0,03-0,06	0,016-0,125	30	34	31-37
Cefixima	0,5	0,25-1	5	25	23-27
Cefotaxima	0,06	0,03-0,125	5	28	25-31
Cefoxitina	4	2-8	30	26	23-29
Cefpodoxima	0,5	0,25-1	10	25-26	23-28
Ceftarolina	0,06	0,03-0,125 ⁷	5	27	24-30
Ceftazidima	0,125-0,25	0,06-0,5	10	26	23-29
Ceftibuten	0,25	0,125-0,5	30	31	27-35
Ceftoloprole	0,06	0,03-0,125 ³	5	28	25-31
Ceftoloxana-tazobactam ^{8,9}	0,25	0,125-0,5 ³	30-10	28	24-32
Ceftriaxona	0,06	0,03-0,125	30	32	29-35
Cefuroxima	4	2-8	30	23	20-26
Cloranfenicol	4	2-8	30	24	21-27
Ciprofloxacino	0,008	0,004-0,016	5	35	30-40
Colistina	0,5-1	0,25-2	-	-	-
Doripenem	0,03	0,016-0,06	10	31	27-35
Ertapenem	0,008	0,004-0,016	10	32-33	29-36
Fosfomicina ¹⁰	1	0,5-2 ³	-	-	-
Gentamicina	0,5	0,25-1	10	22-23	19-26
Imipenem	0,125	0,06-0,25	10	29	26-32
Levofloxacino	0,016-0,03	0,008-0,06	5	33	29-37
Medlinam	0,06-0,125	0,03-0,25	10	27	24-30
Meropenem	0,016-0,03	0,008-0,06	10	31	28-34
Moxifloxacino	0,016-0,03	0,008-0,06	5	31-32	28-35
Ácido nalidixico	2	1-4	30	25	22-28
Netilmicina	-	≤0,5-1	10	21	18-24
Nitrofurantoina	8	4-16	100	20	17-23
Norfloxacino	0,06	0,03-0,125	10	31-32	28-35
Oxofloxacino	0,03-0,06	0,016-0,125	5	31	29-33
Pefloxacino	-	-	5	29	26-32
Piperacilina	2	1-4	30	24	21-27
Piperacilina-tazobactam ¹⁰	2	1-4	30-6	24	21-27
Polimixina B	0,5	0,25-1,0	-	-	-
Ticarcilina-ácido clavulânico ^{4,5}	8	4-16	75-10	27	24-30
Tigeciclina ¹¹	0,125	0,03-0,25	15	23-24	20-27
Tobramicina	0,5	0,25-1	10	22	18-26
Trimetoprim	1	0,5-2	5	24-25	21-28
Sulfametoxazol-trimetoprim ¹²	≤0,5 ²	-	23,75-1,25	26	23-29

Escherichia coli ATCC 25922 (NCTC 12241, CIP 76.24, DSM 1103, CCUG 17620, CECT 434)

Método de Disco-difusão: Agar Mueller-Hinton, McFarland 0,5, ar, 35±1°C, 18±2h. Leta o limite do halo como o ponto evidenciando ausência de crescimento, visto do fundo da placa contra um fundo escuro, sob luz refletida.

	CIM (mg/L)		Conteúdo do disco (µg)	Diâmetro do halo de Inibição	
	Alvo ¹	Intervalo ²		Alvo ¹	Intervalo ³
Amicacina	1-2	0,5-4	30	22-23	19-26
Amoxicilina	4	2-8	-	-	-
Amoxicilina-ácido clavulânico ^{4,5}	4	2-8	20-10	21	18-24 ⁶
Ampicilina	4	2-8	10	18-19	15-22 ⁸
Ampicilina-sulbactam ^{5,7}	2	1-4	10-10	21-22	19-24 ⁸
Aztreonam	0,125	0,06-0,25	30	32	28-36
Cefadroxila	-	-	30	17	14-20
Cefalexina	8	4-16	30	18	15-21
Cefepima	0,03-0,06	0,016-0,125	30	34	31-37
Cefixima	0,5	0,25-1	5	25	23-27
Cefotaxima	0,06	0,03-0,125	5	28	25-31
Cefoxitina	4	2-8	30	26	23-29
Cefpodoxima	0,5	0,25-1	10	25-26	23-28
Ceftazidima	0,06	0,03-0,125	5	27	24-30

Pefloxacin	-	-	5	29	26-32
Piperacilina	2	1-4	30	24	21-27
Piperacilina-tazobactam ¹⁰	2	1-4	30-6	24	21-27
Polimixina B	0,5	0,25-1,0	-	-	-
Ticarcilina-ácido clavulânico ¹¹	8	4-16	75-10	27	24-30
Tigeciclina ¹¹	0,125	0,03-0,25	15	23-24	20-27
Tobramicina	0,5	0,25-1	10	22	18-26
Trimetoprim	1	0,5-2	5	24-25	21-28
Sulfametoxazol-trimetoprim ¹²	≤0,5 ¹	-	23,75-1,25	26	23-29

Muito obrigada!