

BrCAST

Brazilian Committee on
Antimicrobial Susceptibility Testing



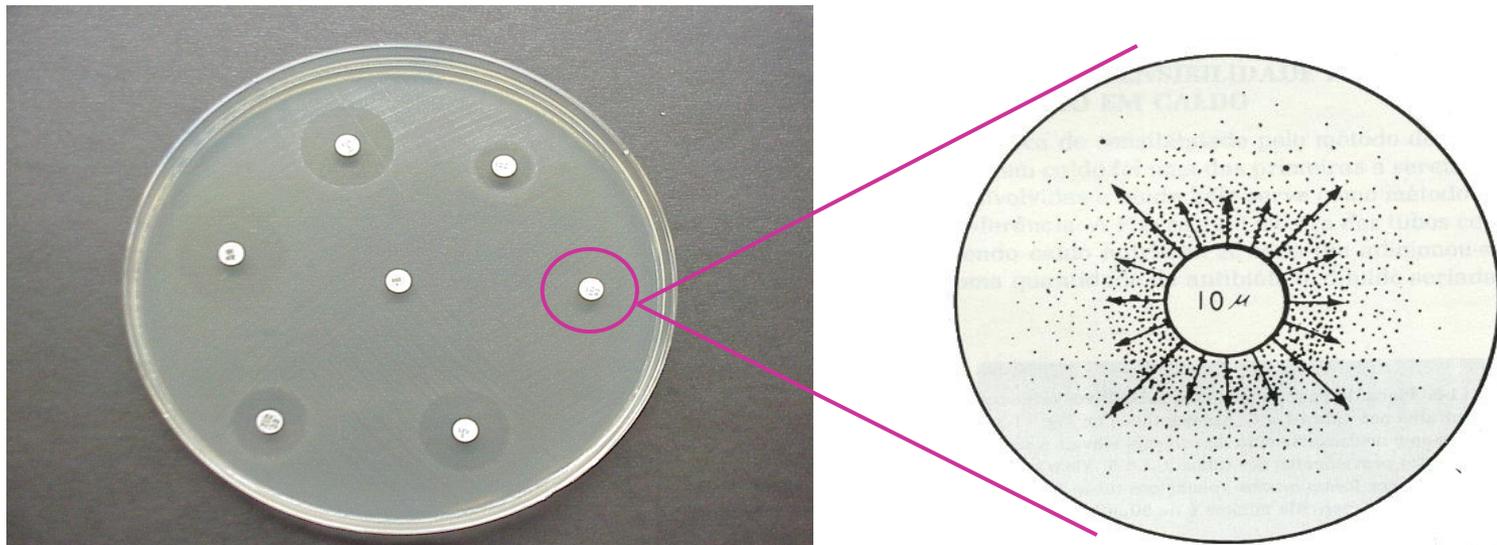
Guia prático de leitura para Disco Difusão segundo o BrCAST

Teste de disco difusão em ágar

MÉTODO DE KIRBY-BAUER (1966)

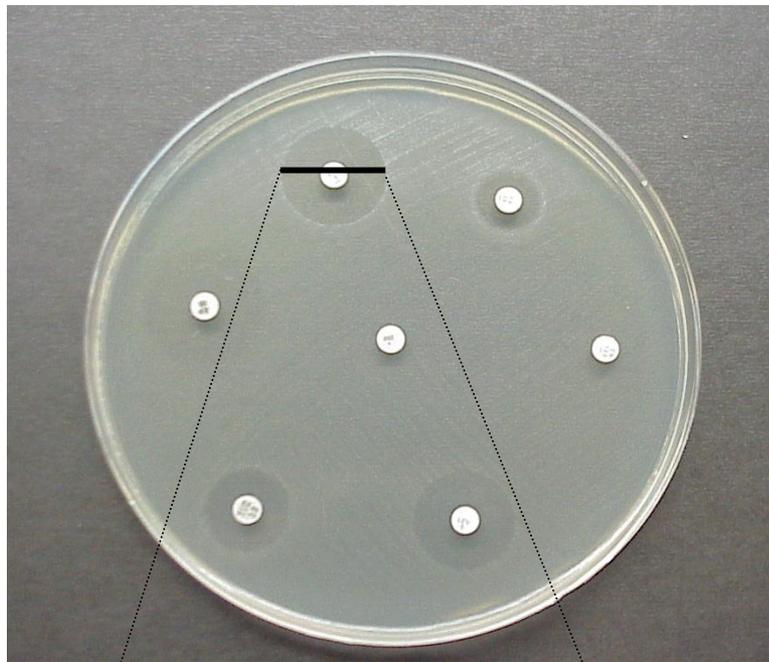
Princípio do método:

Difusão do antibiótico do disco para o ágar, levando a formação de um halo de inibição, que é inversamente proporcional à CIM



Leitura e Interpretação

Medidas dos diâmetros das zonas de inibição e seus valores são comparados a padrões definidos



mm

BrCast 2019

Susceptível (S)

Sensível, aumentando a exposição (I)

Resistente (R)

Disco Difusão em Ágar

VANTAGENS

- ✓ Fácil execução
- ✓ Reprodutibilidade
- ✓ Reagentes de baixo custo
- ✓ Dispensa equipamentos especiais
- ✓ Resultados facilmente interpretados pelos clínicos
- ✓ Flexibilidade quanto a escolha dos antimicrobiano

DESVANTAGENS

- ✓ Resultados qualitativos
- ✓ Falta padronização para alguns antimicrobianos e espécies bacterianas

Observação das placas após incubação

- ✓ Crescimento deve ser confluyente.
- ✓ Uniformemente distribuído na superfície do ágar para obter halos de inibição uniformemente circulares (não distorcidos)
- ✓ Verificar se os diâmetros dos halos de inibição das cepas de controle de qualidade estão dentro dos limites aceitáveis (brcast.org.br).

Leitura dos halos de inibição

- As bordas dos halos de inibição devem ser lidas no ponto de inibição completa do crescimento bacteriano,
- Avaliada a olho nu, com a placa posicionada a cerca de 30 cm dos olhos, com luz refletida (com alguma exceções)
- Aferir o diâmetro do halo com régua, paquímetro ou um leitor automatizado de halos de inibição.

Leitura dos halos de inibição

MH



Leitura na parte posterior (fundo) da placa, contra fundo escuro, sob luz refletida.

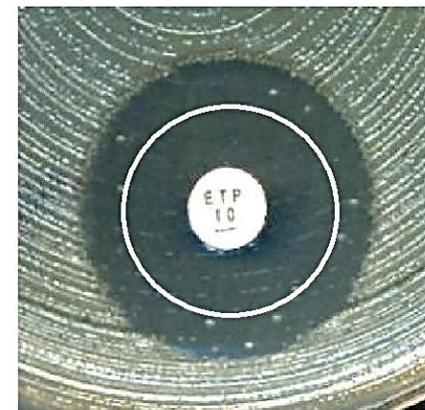
MH-F



Leitura da placa sem tampa, observando a superfície que contém os discos, sob luz refletida.

Colônias dentro do halo de inibição

- ✓ Caso haja colônias dentro do halo de inibição, subcultivar as colônias, verificar a pureza do isolado e, se necessário, repetir o teste.
- ✓ Colônias que não forem contaminação devem ser levadas em consideração na leitura do halo de inibição.

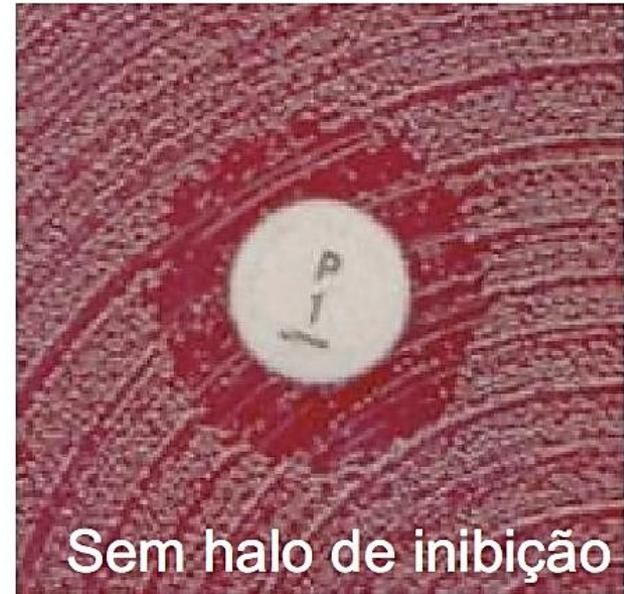


Ler o halo considerando as colônias que estão dentro do halo.

E. coli com
ESBL

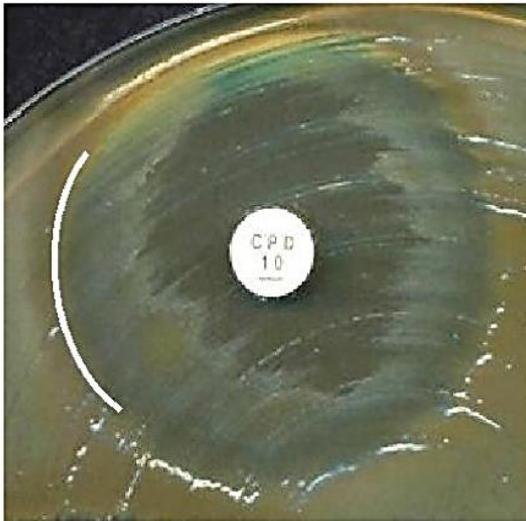


H. influenzae com
mutações em PBP



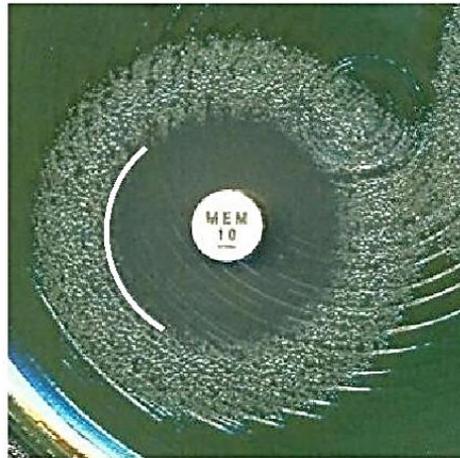
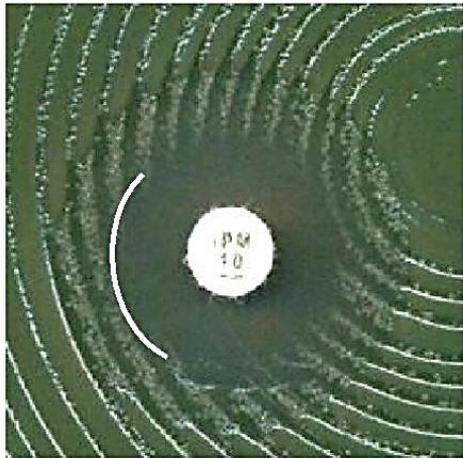
Swarming

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



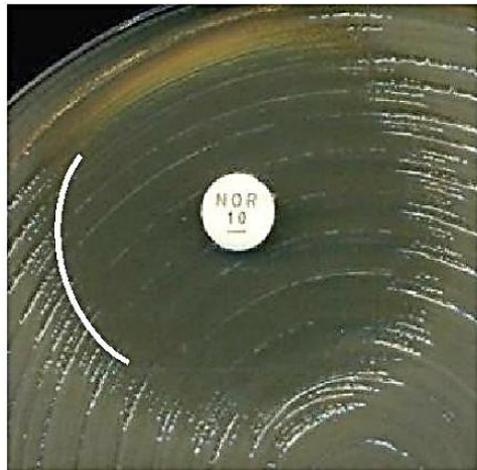
Halos de inibição duplos

- ✓ Verificar a pureza do isolado e repetir o teste se necessário.
- ✓ Colônias que **não** são contaminação devem ser consideradas quando for feita a leitura do halo de inibição.



Halos de Inibição com bordas difusas ou mal definidas - *Enterobacteriaceae*

- Posicionar a placa contra um fundo escuro a cerca de **30** cm do olho nu e estimar as bordas dos halos de inibição.
- **Não** segurar a placa contra a luz (luz transmitida);
- **Não** usar lente de aumento



Halos de inibição com bordas difusas/mal definidas - *Staphylococcus*

- Posicionar a placa contra um fundo escuro a cerca de **30** cm do olho nu e estimar as bordas dos halos de inibição.
- **Não** segurar a placa contra a luz (luz transmitida)
- **Não** usar lente de aumento



Halos 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 - excesso de umidade no meio MH-F



HEMÓLISE

- Ler a inibição do crescimento e não a inibição da hemólise.
- Às vezes é difícil distinguir entre hemólise e crescimento.
- **As β -hemolisinas difundem no ágar. A β -hemólise é geralmente livre de crescimento.**
- **As α -hemolisinas não difundem no ágar. É frequente o crescimento dentro da área de α -hemólise.**
- As bordas dos halos de inibição acompanhadas de α -hemólise são mais comuns com *S. pneumoniae* e antibióticos β -lactâmicos.

β -hemólise

- Inclinando a placa para facilitar a diferenciação entre hemólise e crescimento.
- A β -hemólise é usualmente livre de crescimento.



S. pyogenes



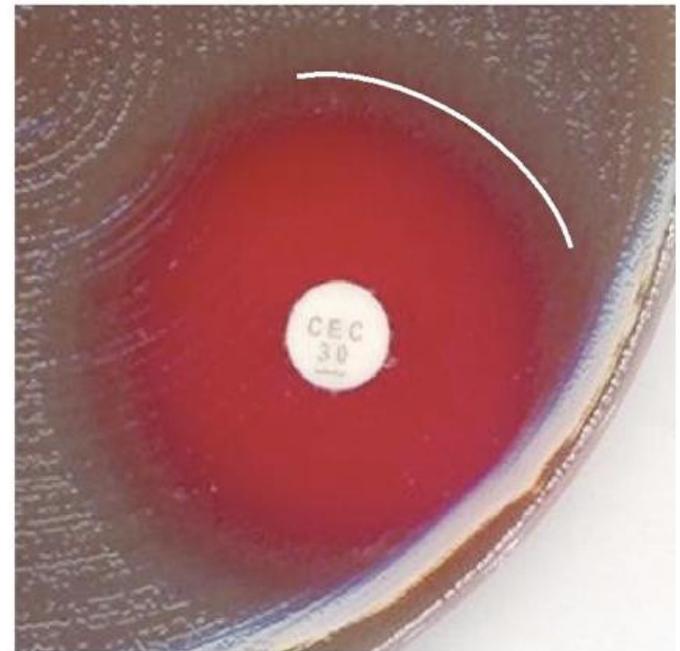
Streptococcus do grupo C

α -hemólise

- Inclinando a placa para facilitar a diferenciação entre hemólise e crescimento.



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



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

Instruções para leituras específicas

- ✓ Trimetoprim e sulfametoxazol-trimetoprim em geral
- ✓ *Stenotrophomonas maltophilia* e sulfametoxazol-trimetoprim
- ✓ *Enterobacteriaceae* e ampicilina
- ✓ *E. coli* e mecilinam
- ✓ *E. coli* e fosfomicina
- ✓ *Enterococcus* e vancomicina
- ✓ *S. aureus* e benzilpenicilina
- ✓ Detecção de resistência induzível à clindamicina em *Staphylococcus* e *Streptococcus*.

Trimetoprim e Sulfametoxazol-trimetoprim

- Seguir as instruções para a leitura e ler o halo interno quando houver halos de inibição duplos.
- **Ignorar névoa ou crescimento suave** até o disco dentro de um halo de inibição com bordas bem definidas.



E. coli



SCoN



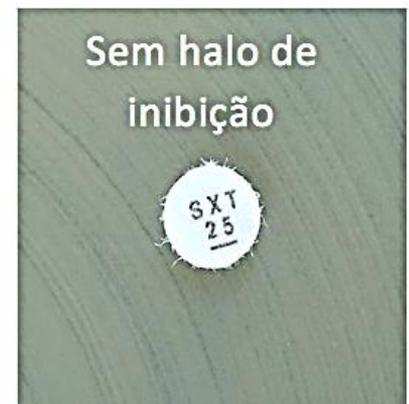
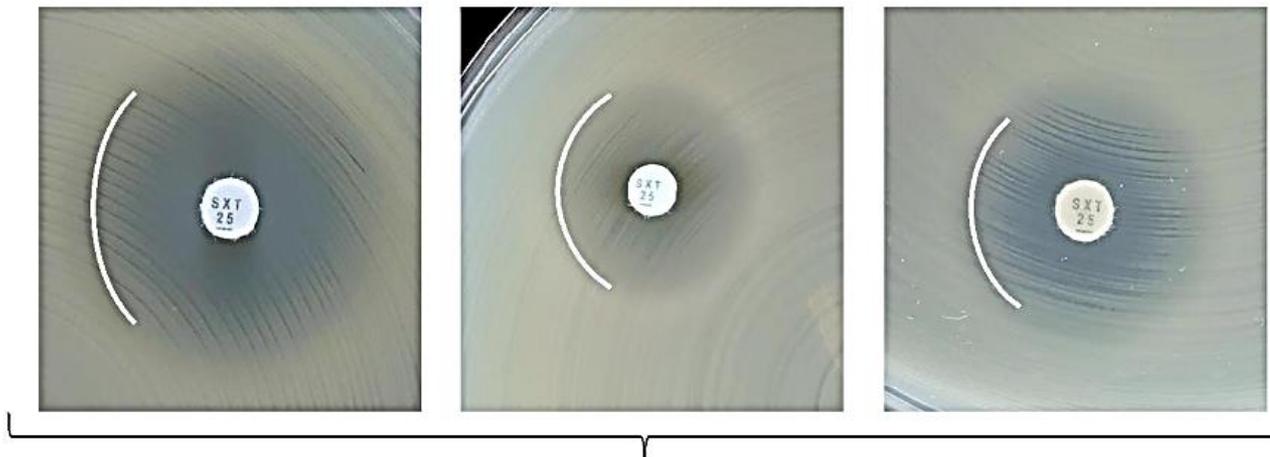
Moraxella



Haemophilus

S. maltophilia e sulfametoxazol-trimetoprim

- **Ignorar o crescimento** dentro do halo de inibição, que é comum em *S. maltophilia* e sulfametoxazol-trimetoprim.
- A densidade desse crescimento pode variar desde uma névoa fina até um crescimento substancial.



Crescimento próximo ao disco e sem halo de inibição = Resistente

Ignorar o crescimento e ler o halo de inibição se as bordas forem visíveis. Se o halo de inibição for ≥ 16 mm = Sensível

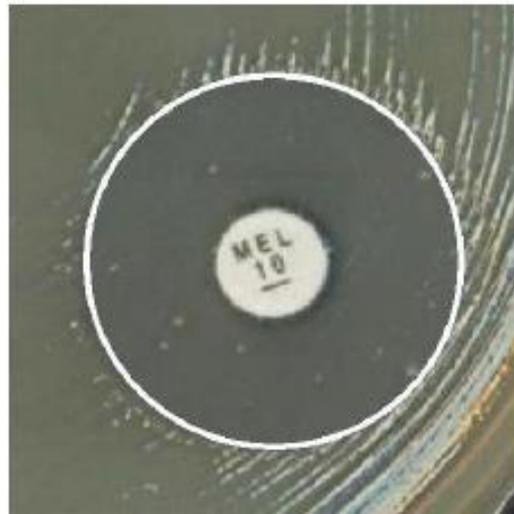
Enterobacteriaceae e ampicilina

- **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.



E. coli e mecilinam

- Ignorar colônias isoladas dentro do halo de inibição



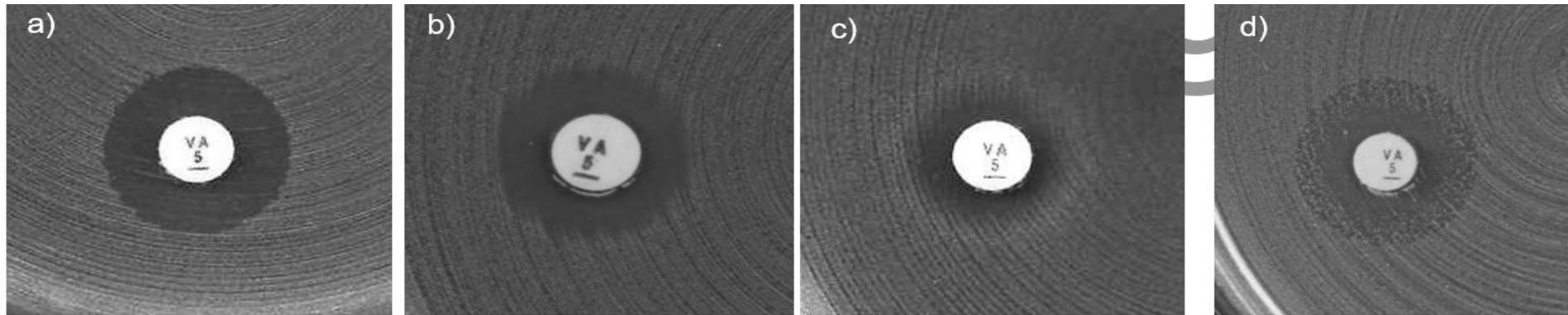
E. coli e fosfomicina

- Ignorar colônias isoladas dentro do halo de inibição

✓ Susceptible	✓ Susceptible	✓ Susceptible	✗ Resistant
			
<p>Ignore all isolated colonies within the inhibition zone and read the outer zone edge.² In <i>E. coli</i>, these colonies are due to a loss of functional UhpT transporter protein. <i>E. coli</i> strains that generate isolated colonies within the inhibition zone (≥ 24mm for <i>E. coli</i>) can be interpreted as susceptible to Fomicyt® IV.³</p>			<p>Record as no inhibition zone²</p>

Enterococcus e vancomicina

- Halos de inibição com **bordas difusas/mal definidas** e colônias dentro do halo indicam **resistência à vancomicina**.
- Se o halo de inibição for ≥ 12 mm e as bordas do halo forem difusas/mal definidas, o isolado deverá ser investigado mais detalhadamente.
- **Leitura contra luz (Luz transmitida)**



E. faecalis
não-VRE

E. faecium
VRE

S. aureus e benzilpenicilina

- A disco-difusão é mais segura do que CIM para a detecção de isolados produtores de penicilinase, desde que o diâmetro do halo de inibição seja aferido e as bordas do halo sejam cuidadosamente inspecionadas
- **Leitura contra a luz (luz transmitida)**



bordas bem definidas e diâmetro
de halo de inibição ≥ 26 mm
(Resistente)



bordas mal definidas/difusas e
diâmetro do halo de inibição ≥ 26 mm
(Sensível)

Detecção de resistência induzível à clindamicina em *Staphylococcus*

- A resistência induzível à clindamicina pode ser detectada pelo antagonismo da atividade da clindamicina e um macrolídeo.
- Posicionar os discos de eritromicina e clindamicina a uma distância de **12-20 mm** (borda a borda) e observar se há antagonismo (**fenômeno D**).



Detecção de resistência induzível à clindamicina em *Streptococcus*

- A resistência induzível à clindamicina pode ser detectada pelo antagonismo da atividade da clindamicina e um macrolídeo.
- Posicionar os discos de eritromicina e clindamicina a uma distância de **12-16 mm** (borda a borda) e observar se há antagonismo (fenômeno D).



Guia de leitura



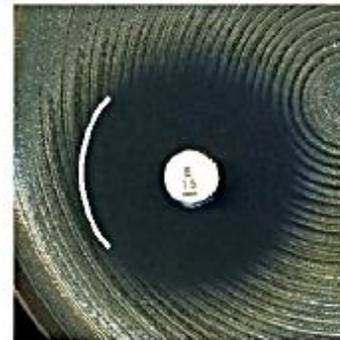
As bordas dos halos de inibição devem ser lidas no ponto de completa inibição do crescimento, a olho nu com a placa à 30 cm dos olhos



E. coli
Ciprofloxacino



S. aureus
Linezolida



S. aureus
Eritromicina



Enterobacteriaceae
Ampicilina



S. pneumoniae
Cloranfenicol



S. pneumoniae
Tetraciclina



S. pneumoniae
Cefaclor

Quase sempre há crescimento dentro da área de α -hemólise!

Obrigada!!!!



<https://loonylabs.files.wordpress.com/2015/01/super-bugs.jpg?w=590>

anapdca@ioc.fiocruz.br