

### Métodos para detecção de resistência bacteriana

**Este material pode ser usado tal como está, traduzida ou adaptada. Deve incluir a citação “Este material pode ser consultado na sua versão original em <http://brcast.orgvet.br/>”.**

#### **1. Preparação de inóculo bacteriano para teste de susceptibilidade e/ou triagem de fenótipos de resistência**

- a) Transferir de 3-4 colônias (de no máximo 24 horas de crescimento) de uma placa de ágar MacConkey para 3 mL de caldo Mueller Hinton, para obter uma turvação correspondente à escala 0,5 de McFarland [aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  unidades formadoras de colônias (UFC)/mL].
  - O ajuste da turvação pode ser realizado através de medida de absorvância em espectrofotômetro com comprimento de onda de 625 nm ou através da comparação visual utilizando tubos de escala padrão com cloreto de bário.
- b) Inserir um swab estéril na suspensão bacteriana, pressioná-lo contra as paredes do tubo para retirar o excesso de inóculo e semear em placas de ágar Mueller Hinton em três direções diferentes.
- c) Deixar a placar secar em temperatura ambiente por aproximadamente 5 minutos.

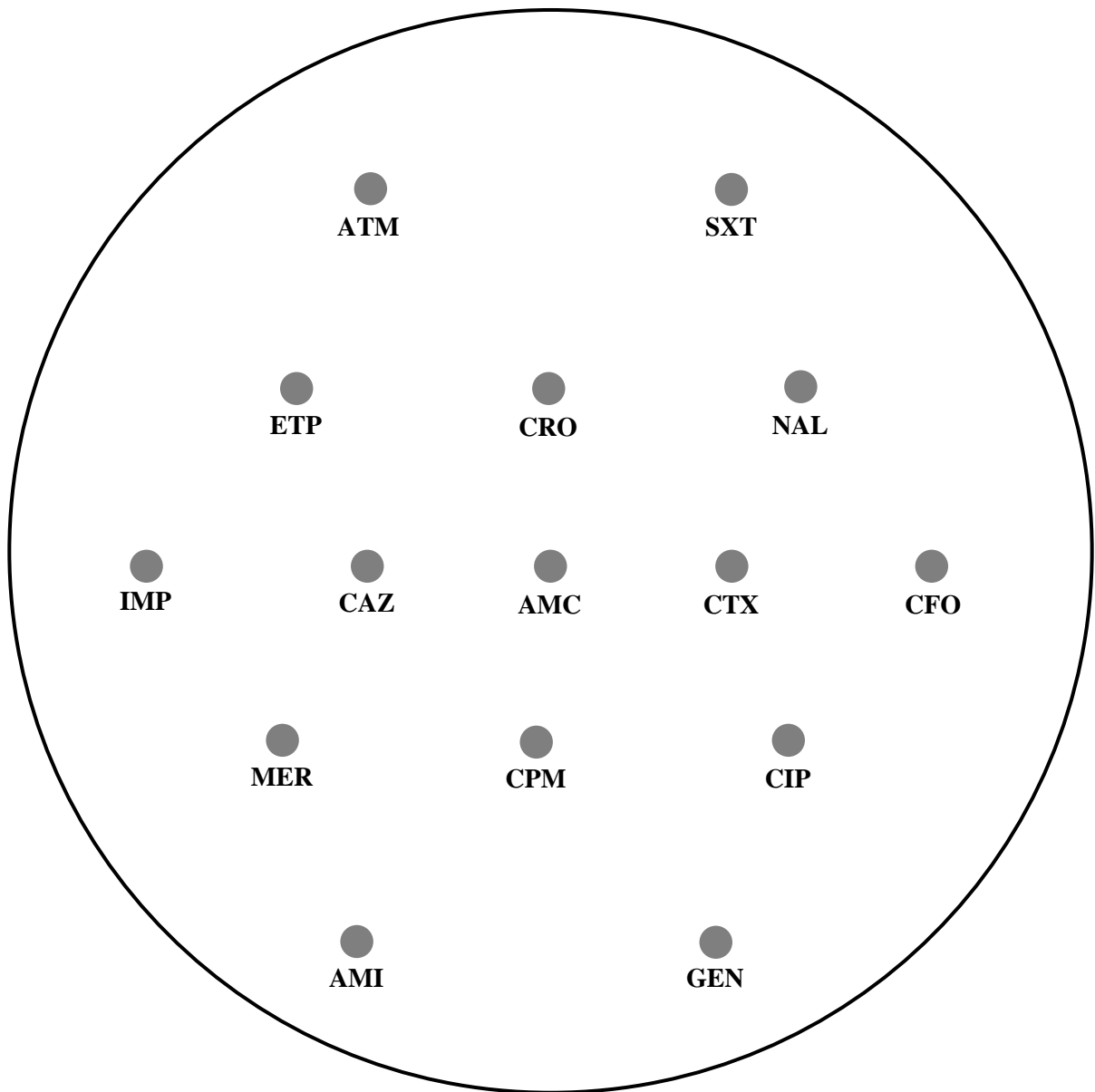
#### **2. Seleção de bactérias gram-negativas resistentes às cefalosporinas**

- a) Estriar os swabs das amostras em placas de ágar MacConkey suplementado com 2 µg/mL de ceftriaxona (CRO).
- b) Incubar em estufa bacteriológica a 37 °C, por 18-24 horas.

Após crescimento em ágar MacConkey suplementado com ceftriaxona, selecionar colônias para realização do teste de susceptibilidade pelo método de Kirby-Bauer.

**3. Teste de susceptibilidade antimicrobiana por disco difusão (técnica de Kirby-Bauer)**

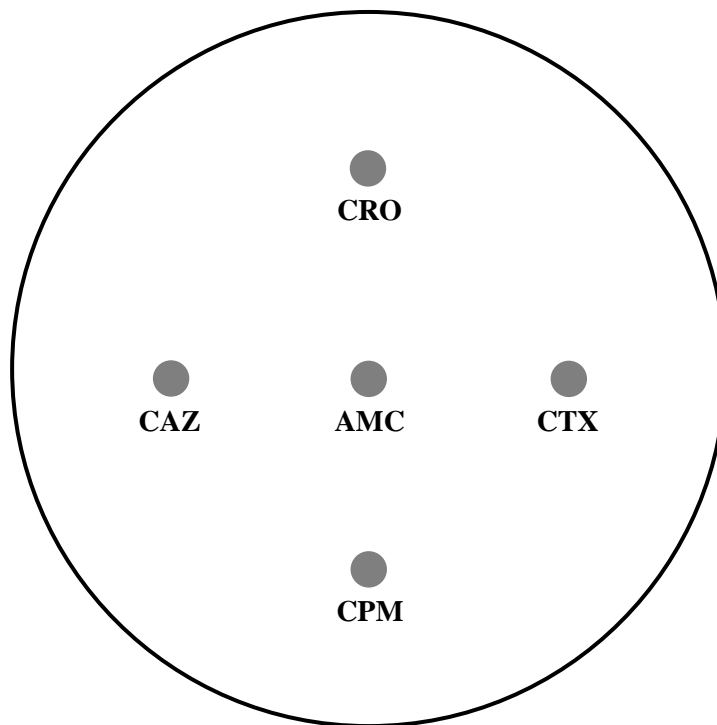
- a) Preparar o inóculo e semeá-lo conforme descrito no item 1.
- b) Dispor os discos de antibióticos na placa com auxílio de pinça, conforme o esquema abaixo:



#### 4. Detecção fenotípica dos principais mecanismos de resistência em bactérias gram-negativas

##### 4.1. Teste de detecção de $\beta$ -lactamases de espectro expandido (ESBL) por disco aproximação

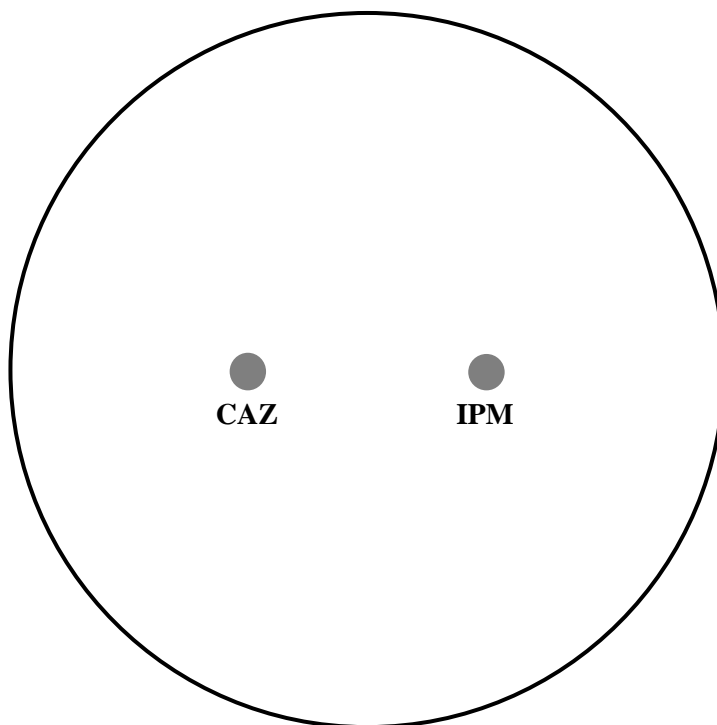
- Preparar o inóculo e semeá-lo conforme descrito no item 1.
- Dispor os discos de antibióticos na placa, com 2,5 cm de distância um do outro, com auxílio de pinça, conforme o esquema abaixo:



- Incubar em estufa bacteriológica a 37 °C, por 18-24 horas.

#### ***4.2. Teste de detecção de AmpC plasmidial induzida por disco aproximação***

- a) Preparar o inóculo e semeá-lo conforme descrito no item 1.
- b) Dispor um disco de ceftazidima (CAZ) ao lado de um disco de imipenem (IPM), com 3 cm de distância, com auxílio de pinça, conforme o esquema abaixo:

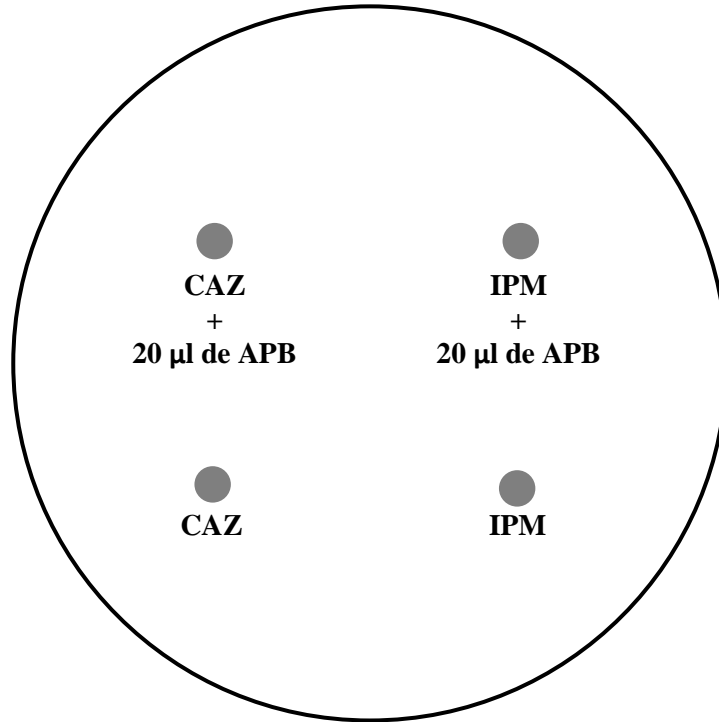


- c) Incubar em estufa bacteriológica a 37 °C, por 18-24 horas.

#### ***4.3. Teste por ácido fenilborônico (APB) com discos (detecção de AmpC e KPC)***

- a) Dissolver 120 mg de APB em 3 mL de DMSO (dimetilsulfóxido).
- b) Adicionar 3 mL de água destilada estéril a esta solução e homogeneizar até dissolver.
- c) Pingar 20 µL da solução de APB em discos de ceftazidima (CAZ) e de imipenem (IPM) e deixar secar a temperatura ambiente, por aproximadamente 30 minutos.
- d) Preparar o inóculo e semeá-lo conforme descrito no item 1.
- e) Dispor os discos de antibióticos na placa com auxílio de pinça, conforme o esquema abaixo:

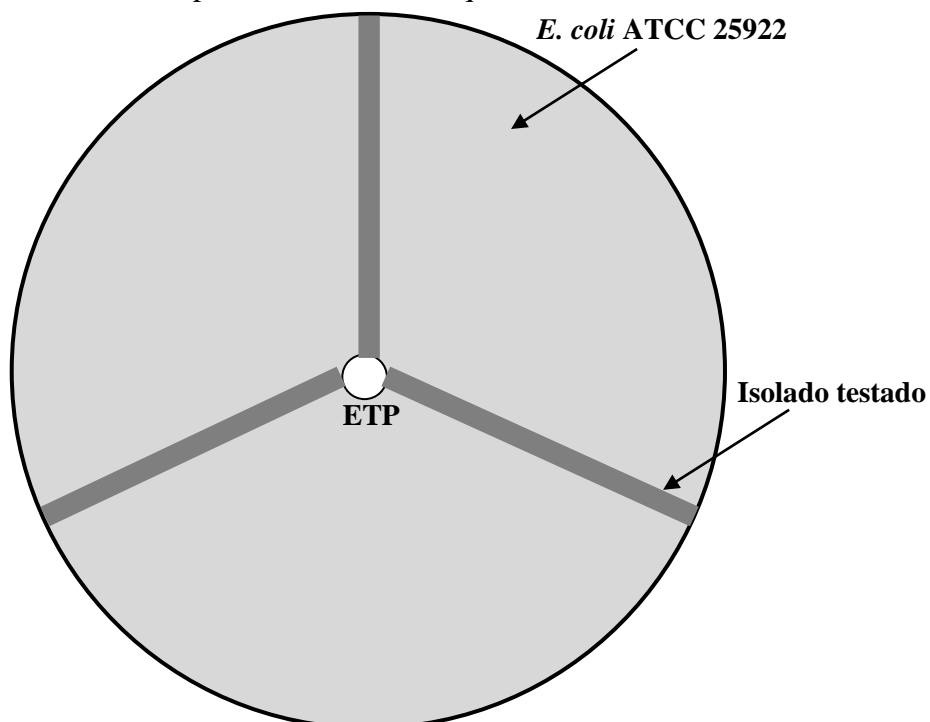




f) Incubar em estufa bacteriológica a 37 °C, por 18-24 horas.

#### 4.4. *Teste de Hodge modificado para detecção de bactérias produtoras de carbapenemase*

- Preparar o inóculo e semeá-lo conforme descrito no item 1, utilizando a cepa *Escherichia coli* ATCC 25922.
- Adicionar disco de ertapenem (ETP) ou meropenem (MER) no centro da placa.
- Utilizando uma alça bacteriológica, pegar 3-5 colônias da bactéria a ser testada e inocular em uma linha reta (estria) da borda do disco de antibiótico para a extremidade da placa, conforme o esquema abaixo:



- d) Incubar em estufa bacteriológica a 37 °C, por 18-24 horas.

#### **4.5. Teste de detecção de metalo- $\beta$ -lactamases (MBL) com disco com EDTA**

- a) Preparar o inóculo e semeá-lo conforme descrito no item 1.
- b) Posicionar na placa um disco de imipenem (IPM) impregnado com 10  $\mu$ L de EDTA (0,1 mM) e outro disco apenas com imipenem (IPM).
- c) Incubar em estufa bacteriológica a 37 °C, por 18-24 horas.

#### **4.6. Teste para detecção de metalo- $\beta$ -lactamases (MBL) por fita reagente Etest®**

- a) Preparar o inóculo e semeá-lo conforme descrito no item 1.
- b) Posicionar a fita de Etest® MBL IP/IPI (imipenem/imipenem+EDTA) com a escala numérica na face superior e o gradiente da concentração do antimicrobiano em contato com o ágar.
- c) Após a colocação da fita, pressioná-la levemente com o auxílio de uma pinça para remoção das bolhas de ar que possam ter se formado.
  - Uma vez colocada a fita, não removê-la, pois a difusão do antibiótico no ágar é imediata.
- d) Incubar em estufa bacteriológica a 37 °C, por 18-24 horas.

### **5. Triagem de fenótipos de resistência em bactérias gram-positivas**

#### **5.1. Detecção por disco difusão de *Staphylococcus* spp. resistente à metililina/oxacilina (MRSA)**

- a) Preparar o inóculo e semeá-lo conforme descrito no item 1.
- b) Posicionar um disco de oxacilina (OXA) e outro de cefoxitina (CFO) na placa.
- c) Incubar em estufa bacteriológica a 37 °C, por 18-24 horas.

#### **5.2. Detecção por disco difusão de *Enterococcus* spp. resistente à vancomicina (VRE)**

- a) Preparar o inóculo e semeá-lo conforme descrito no item 1.

- b) Posicionar um disco de vancomicina (VAN) na placa.
- c) Incubar em estufa bacteriológica a 37 °C, por 18-24 horas.

## **6. Interpretação dos testes**

### **6.1. Interpretação do antibiograma por disco difusão (Kirby-Bauer)**

As interpretações dos antibiogramas serão baseadas nos pontos de corte (*breakpoints*) do comitê americano CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute).

- a) Medir o diâmetro da zona de inibição do antibiótico.
- b) Observar a presença de colônias dentro do halo de inibição. Se sim, checar a pureza da amostra e realizar o teste novamente.
- c) Classificar a bactéria como sensível, intermediária ou resistente a cada um dos antibióticos, de acordo com os *breakpoints* estabelecidos para cada bactéria.

### **6.2. Teste de detecção de $\beta$ -lactamases de espectro expandido (ESBL) por disco aproximação**

O aumento do halo de inibição de qualquer uma das cefalosporinas em direção ao disco contendo ácido clavulânico ou o aparecimento de zona fantasma entre os discos das cefalosporinas e o disco de amoxicilina/ácido clavulânico indica a produção de ESBL.

### **6.3. Teste de detecção de AmpC plasmidial induzida por disco aproximação**

O achatamento do halo de inibição da ceftazidima (CAZ) indica a produção de AmpC plasmidial.

### **6.4. Teste por ácido fenilborônico (APB) com discos (detecção de AmpC e KPC)**

- Diferença entre discos com e sem APB  $\geq 4$  mm: Positivo para KPC.
- Diferença entre discos com e sem APB  $\geq 4$  mm apenas na CAZ: Sugestivo de AmpC.



- Diferença entre discos com e sem APB  $\geq 4$  mm apenas no IPM: Pode haver uma ESBL além da KPC.

#### **6.5. Teste de Hodge modificado para detecção de bactérias produtoras de carbapenemase**

Observar se há crescimento aumentado da *E. coli* ATCC 25922 em torno do isolado testado na intersecção da estria com a zona de inibição do antibiótico.

- Crescimento aumentado: positivo para a produção de carbapenemase.
- Sem crescimento aumentado: negativo para a produção de carbapenemase.

#### **6.6. Teste de detecção de metalo- $\beta$ -lactamases em disco com EDTA**

- Diferença entre discos com e sem EDTA  $\geq 3$  mm: Positivo para MBL.

#### **6.7. Teste para detecção de metalo- $\beta$ -lactamases por fita reagente Etest®**

A detecção do fenótipo MBL pela metodologia Etest® utiliza o princípio da redução da concentração inibitória mínima (CIM) do  $\beta$ -lactâmico na presença do EDTA. A fita plástica é impregnada com antibiótico  $\beta$ -lactâmico em uma extremidade, e na outra extremidade, o mesmo  $\beta$ -lactâmico é associado ao EDTA. A amostra será considerada produtora de MBL se houver a redução  $\geq 3$  diluições da CIM da associação  $\beta$ -lactâmico/EDTA àquela do  $\beta$ -lactâmico sozinho.

#### **6.8. Detecção por disco difusão de *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina/oxacilina (MRSA)**

- a) Medir o diâmetro da zona de inibição do antibiótico.
- b) Classificar o isolado como sensível, intermediário ou resistente, de acordo com o *breakpoint* estabelecido pelo CLSI, para *Staphylococcus* spp.

**6.9. Detecção por disco difusão de *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina (VRE)**

- a) Medir o diâmetro da zona de inibição do antibiótico.
- b) Classificar o isolado como sensível, intermediário ou resistente, de acordo com o *breakpoint* estabelecido pelo CLSI, para *Enterococcus* spp.