



Metodologia - Teste rápido de sensibilidade aos antimicrobianos (RAST) diretamente de frascos de hemocultura positivos BrCAST-EUCAST

**Versão 5.0 do EUCAST de março 2024
Versão BrCAST, válida a partir de 13-05-2024**

Alterações em relação à versão anterior (v. 4.0)

Seção	Alterações
Introdução	Informação adicionada sobre espécies com pontos de corte para 16-20 horas.
Tabela 1	Informação adicionada sobre espécies com pontos de corte para 16-20 horas.
Tabela 2	Dados adicionados para 16-20 horas.
Recomendações para controle de qualidade	<ul style="list-style-type: none">• Informações adicionadas sobre as cepas disponíveis para os critérios de controle de qualidade (CQ) em 16-20 horas.• Informações adicionadas sobre sangue de cavalo desfibrinado.

O RAST BrCAST-EUCAST baseia-se na metodologia padrão do método de disco-difusão do EUCAST, mas com modificação do inóculo, redução do tempo de incubação, modificação nas instruções de leitura de halos de inibição e pontos de corte específicos para o RAST.

O objetivo do método RAST BrCAST-EUCAST é possibilitar resultados rápidos de testes de sensibilidade diretamente de frascos de hemocultura positivos. O método fornece pontos de cortes específicos para leituras em 4, 6 e/ou 8 horas de incubação. Além disso, foram desenvolvidos pontos de corte RAST para 16-20 horas de incubação. Os resultados devem ser lidos entre 16-20 horas somente quando não é possível ler os resultados em 4, 6 e/ou 8 horas de incubação.

O método foi validado para as seguintes espécies: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* (incluindo *Klebsiella variicola* e *Klebsiella quasipneumoniae*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* e *Streptococcus pneumoniae*.

Preparação dos frascos de hemocultura

O método RAST foi validado utilizando frascos de hemocultura dos sistemas BACTEC (Becton Dickinson), BacT/ALERT (bioMérieux) e VersaTREK (Thermo Fisher). O método RAST pode ser realizado entre 0-18 horas após o sistema automatizado ter sinalizado a positividade do frasco de hemocultura. Os frascos positivos não devem ser removidos do equipamento até que esteja tudo pronto para processar o RAST. No entanto, para permitir o transporte de frascos positivos de um local para outro, o impacto de manter os frascos positivos à temperatura ambiente após a remoção do equipamento foi avaliado. Os resultados do RAST não foram afetados quando os frascos positivos foram retirados do aparelho e permaneceram à temperatura ambiente, por até 3 horas, antes do processamento do teste. O RAST não deve ser realizado em hemoculturas com crescimento de mais do que uma espécie de microrganismo (culturas mistas).

Inoculação nas placas de ágar de amostras de frascos de hemocultura

Inocular 125±25 µl de amostra não diluída retirada diretamente do frasco de hemocultura positivo nas placas de ágar Mueller Hinton (MH) ou Mueller Hinton-F (MH-F) de 90 mm. Espalhar o inóculo suavemente sobre a superfície do ágar, com auxílio de um *swab* e em três direções (ou utilizar um rotor automático de placas) e aplicar os discos como para o teste de sensibilidade padrão (TSA). Utilizar entre 4 a 6 discos no máximo por placa para evitar interferência entre os agentes antimicrobianos. Inocular as placas, aplicar os discos de antimicrobianos e incubar as placas sem demora.

Incubação e leitura das placas

Incubar as placas conforme descrito na Tabela 1. Ler os diâmetros dos halos de inibição no tempo indicado para a leitura (4, 6 e/ou 8 horas) ± 5 minutos. Se necessário, incubar novamente as placas dentro de no máximo 10 minutos para permitir a leitura posterior (6 e/ou 8 horas). Se for necessário incubar as placas por um período maior do que 8 horas, ler os diâmetros dos halos de inibição entre 16-20 horas. **Não incubar ou ler as placas após 20 horas de incubação.**

Tabela 1. Condições de incubação das placas para teste de sensibilidade a antimicrobianos

Microrganismo	Tempo de incubação	Meio	Incubação
<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i>	4, 6 e 8 horas 16-20 horas	MH	35±1°C em ar ambiente
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6 e 8 horas 16-20 horas	MH	35±1°C em ar ambiente
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	4, 6 e 8 horas 16-20 horas	MH-F	35±1°C com 4-6% de CO ₂

Avaliação das placas após incubação

4, 6 e 8 horas de incubação

Em 4, 6 e 8 horas de incubação, o crescimento na placa de ágar Mueller-Hinton frequentemente estará menos nítido do que com disco-difusão padrão BrCAST-EUCAST. **Os halos de inibição só devem ser lidos quando o crescimento estiver confluyente e as bordas dos halos estiverem claramente visíveis. Ver exemplo na Figura 1.**

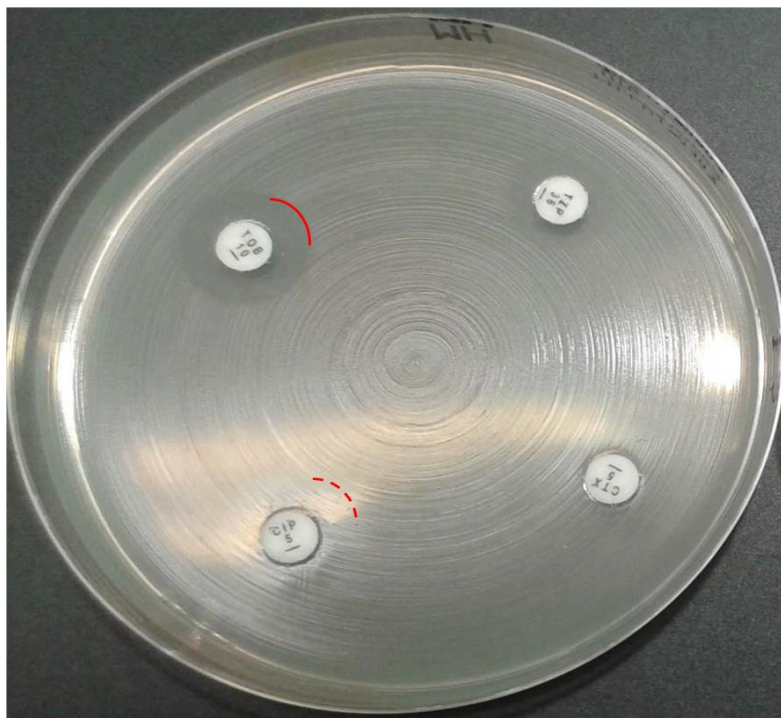


Figura 1. *E. coli* após 4 horas de incubação. Os halos de inibição com uma borda claramente visível devem ser lidos (linha sólida) e os halos sem borda nítida não devem ser lidos (linha pontilhada).

16-20 horas de incubação

Na incubação do RAST entre 16-20 horas, o crescimento na placa de ágar Mueller-Hinton frequentemente aparecerá mais denso, estará mais nítido, comparado com o método de disco difusão padrão BrCAST-EUCAST, ver exemplo na Figura 2.

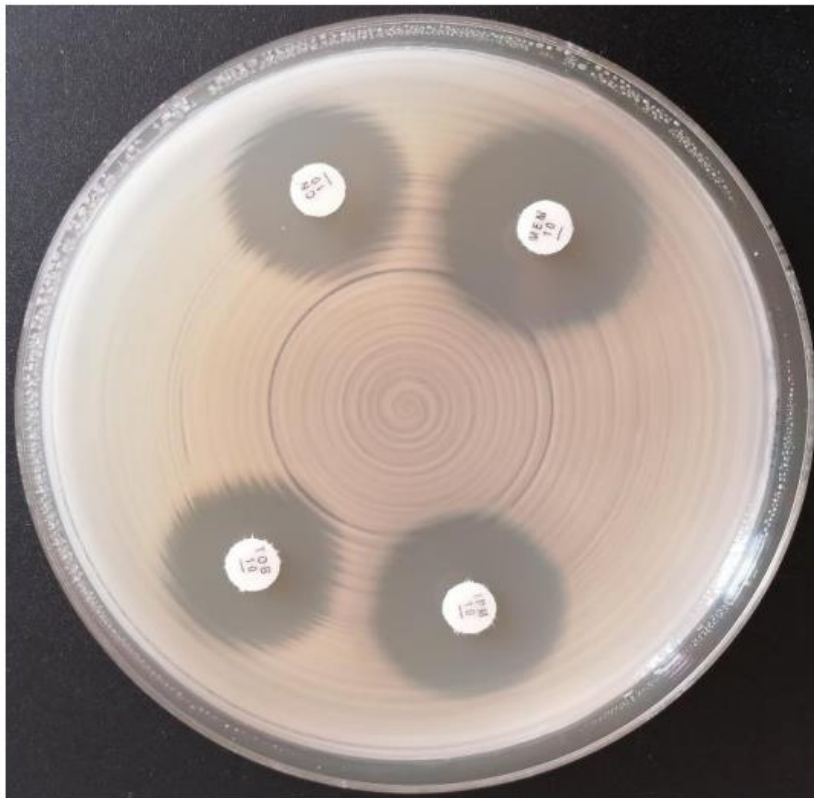


Figura 2. *E. coli* entre 16-20 horas de incubação.

Aferição dos diâmetros dos halos de inibição

Instruções gerais de leitura

- Ler as placas de MH contra um fundo escuro e as placas de MH-F contra um fundo claro. Posicionar a placa cerca de 30 cm dos olhos, segurar a placa em um ângulo de 45° em relação à bancada de trabalho pode facilitar a leitura. Inclinar a placa em sua direção para identificar as bordas dos halos de inibição de forma mais nítida.
- Medir o diâmetro dos halos de inibição manualmente no milímetro mais próximo. O método RAST não foi validado para leitores de halos automatizados.
- Crescimento escasso dentro de um halo de inibição com uma borda nítida deve ser ignorado. Ocasionalmente isto ocorre em leituras precoces de *E. coli* ou *K. pneumoniae* e mais frequentemente para antimicrobianos β -lactâmicos.

Instruções específicas para leituras em 4, 6 e 8 horas de incubação

- Ler ambas as placas MH e MH-F **com a tampa removida, observando a superfície contendo os discos, sob luz refletida.**
- Para *Acinetobacter baumannii*, ao testar sulfametoxazol-trimetoprima, ler a borda externa do halo de inibição e ignorar o crescimento dentro do halo.
- Às vezes não há halo de inibição evidente em 4 horas, mas o diâmetro do halo pode ser facilmente medido em 6 horas (Tabela 2). Nem sempre é possível ler halos de inibição para todos os antimicrobianos testados.

Instruções específicas para leituras entre 16-20 horas de incubação

- Entre 16-20 horas ler **as placas de MH pelo seu fundo (parte posterior), com luz refletida e as placas de MH-F com a tampa removida, observando a superfície contendo os discos, sob luz refletida.**
- Para *P. aeruginosa* ao testar piperacilina-tazobactam, imipenem, imipenem-relebactam, meropenem e meropenem-vaborbactam, ignorar colônias isoladas dentro do halo de inibição e ler a borda externa do halo. Ver exemplo na Figura 3.



Figura 3. Ignorar colônias isoladas dentro do halo de inibição e ler a borda externa do halo

Tabela 2. Proporção de diâmetros de halos de inibição (%) com possibilidade de leitura* em 4 - 20 horas de incubação

Microrganismo	4 horas (%)	6 horas (%)	8 horas (%)	16-20 horas (%)
<i>Escherichia coli</i>	90	99	99	100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	96	98	98	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> **	-	88	97	100
<i>Acinetobacter baumannii</i>	99	100	100	100
<i>Staphylococcus aureus</i>	55***	91	95	100
<i>Enterococcus faecalis</i>	93	99	100	100
<i>Enterococcus faecium</i>	44	93	99	100
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	68	83	95	100

*A tabela mostra “possível de ler”, não “possível de interpretar”, uma vez que alguns diâmetros de halo de inibição podem estar na AIT.

**Para alguns isolados de *P. aeruginosa* há um crescimento escasso no RAST. Os isolados geralmente apresentam um crescimento escasso no disco-difusão padrão, como também em 16-20 horas de incubação (RAST).

***Cefoxitina e aminoglicosídeos são facilmente lidos enquanto norfloxacino e clindamicina são mais difíceis de avaliar.

Interpretação dos resultados

- Interpretar os diâmetros de halos de inibição aferidos de acordo com a versão mais recente das tabelas de ponto de corte do RAST.
- Às vezes não é possível reportar a categoria de sensibilidade para todos os antimicrobianos testados, ou porque não há crescimento, impossibilitando a leitura do halo de uma forma confiável ou porque o diâmetro do halo está na AIT. Nesses casos, não reportar o resultado para o antimicrobiano em questão. Sugerimos que os laboratórios incluam um comentário nos laudos de hemoculturas positivas explicando por que alguns resultados podem não ser reportados. Comentário sugerido: “Os testes de sensibilidade aos antimicrobianos diretamente de frascos de hemocultura positivos, cujos resultados podem ser disponibilizados em 4, 6 e/ou 8 horas, requerem que apenas resultados confiáveis sejam reportados. Portanto, laudos com antimicrobianos não reportados após incubação reduzida podem ser complementados posteriormente.”

Área de Incerteza Técnica (AIT)

AIT é um intervalo de diâmetros de halos de inibição. Existem AITs para todas as combinações de microrganismo-agente antimicrobiano com o método RAST BrCAST-EUCAST. AIT representa uma área onde a separação entre categorias de sensibilidade é incerta. Os erros de interpretação aumentam drasticamente nesta área e a interpretação não é possível. Os resultados acima ou abaixo da AIT podem ser comunicados de forma confiável.

Quando um resultado se encontra no intervalo da AIT, não pode ser interpretado. Não hesitar em deixar o resultado em branco para o agente antimicrobiano em questão. Em 4 horas, voltar a incubar as placas dentro de 10 minutos e efetuar uma nova leitura em 6 horas e, se necessário, em 8 horas e, quando necessário, entre 16-20 horas. Se não for possível obter um resultado completo em 8 ou entre 16-20 horas de incubação, efetuar o TSA com o método de disco-difusão padrão do BrCAST-EUCAST.

Recomendações para o controle de qualidade (CQ)

Para o método de disco-difusão padrão, o EUCAST recomenda que o controle interno de qualidade seja realizado diariamente para validar o procedimento e os insumos utilizados no TSA. **O BrCAST recomenda que os testes dos controles devem ser realizados e validados, no mínimo, semanalmente para os antimicrobianos que fazem parte dos testes de rotina.**

O EUCAST também desenvolveu critérios para controle de qualidade para 4, 6, 8 e 16-20 horas para cinco cepas de CQ (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212 e *S. pneumoniae* ATCC 49619). Os critérios estão disponíveis nas tabelas de CQ do RAST. O procedimento de CQ para o RAST é realizado principalmente para calibrar e validar a implementação do novo procedimento. Todos os tempos de leitura utilizados no laboratório devem ser validados utilizando as cepas CQ. Após validação e implementação do RAST, o controle de qualidade do teste rápido não é mais necessário, devendo ser realizado somente em casos de mudanças na equipe técnica do laboratório ou alterações dos insumos utilizados (sistema de hemocultura, meios de cultura e/ou discos de antimicrobianos). O CQ interno normal da metodologia de disco-difusão padrão deve ser realizado de acordo com as recomendações, para controlar materiais e equipamentos utilizados.

O CQ do RAST é realizado inoculando 1 mL de uma suspensão com 100-200 UFC/mL* de cada cepa controle em um frasco de hemocultura, com adição de aproximadamente 5 mL de sangue desfibrinado estéril de carneiro ou cavalo. Os frascos inoculados devem ser incubados no equipamento de hemocultura e processados de acordo com a metodologia rápida, logo após o sistema automatizado ter sinalizado a positividade.

*100 - 200 UFC/mL = Suspensão ajustada a 0.5 McFarland diluída 1:1.000.000, ver exemplo na Figura 4.

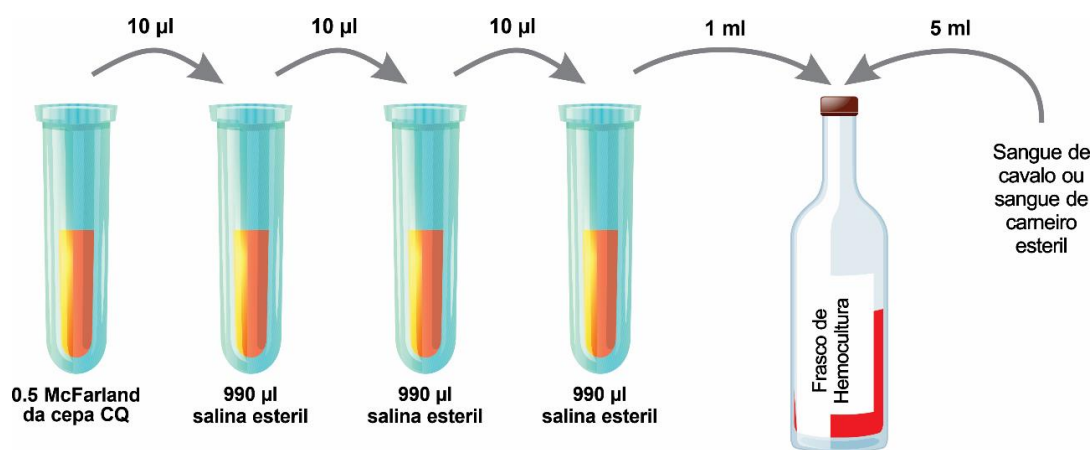


Figura 4. Preparo da amostra para realização do CQ do RAST. **Ilustração Livia Scheffer Santos.**

1. Preparar uma suspensão 0,5 McFarland para cada cepa CQ.
2. Realizar a diluição seriada, conforme demonstrado na figura 4, e adicionar 1 mL da diluição final ao frasco de hemocultura; adicionar também 5 mL de sangue desfibrinado estéril de carneiro ou cavalo.
3. Incubar o frasco no equipamento de hemocultura.
4. Processar o frasco de hemocultura conforme descrito na metodologia RAST quando o equipamento sinalizar a positividade.
5. Utilizar os critérios de CQ RAST disponíveis no documento específico de CQ RAST para avaliar os resultados.

Considerações importantes ao utilizar a metodologia RAST BrCAST-EUCAST

- Ler os halos de inibição somente quando o crescimento for confluyente e as bordas estiverem claramente visíveis.
- Ler os halos de inibição somente nas horas de leitura designadas, ou seja, em 4, 6 e 8 horas e, quando isto não for possível, entre 16-20 horas.
- Usar a tabela de pontos de corte específica do **RAST** BrCAST-EUCAST, e não a tabela de ponto de cortes clínicos, para interpretar os resultados nas categorias de sensibilidade.