

# Discos para Antibiotograma

## Introdução

Para se medir a sensibilidade *in vitro* das bactérias aos agentes antimicrobianos, podemos utilizar diversas técnicas que estão disponíveis nos dias de hoje. Na grande maioria dos laboratórios clínicos, o teste de difusão em agar é o método de eleição para se testar a sensibilidade das bactérias patogênicas de rápido crescimento. Esta instrução de uso inclui uma série de recomendações que ajudarão a padronizar a realização dos testes. As recomendações do International Collaborative Study (ICS) e as propostas da Food and Drug Administration (FDA) foram revisadas e incorporadas a esta instrução de uso.

Os métodos que se baseiam somente na verificação da presença ou ausência de uma zona de inibição sem estabelecer um critério quantitativo para a medida do halo não são aceitáveis. Resultados mais confiáveis podem ser obtidos com a medida do halo de inibição sendo correlacionados com a concentração inibitória mínima e o comportamento de cepas conhecidas clinicamente sensíveis e resistentes.

O método do antibiotograma recomendado pelo CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute) baseia-se no método originalmente descrito por Bauer et al. Este é o método mais exato para os quais foram desenvolvidas tabelas de sensibilidade e resistência e possuem o suporte de dezenas de anos de estudos clínico-laboratoriais extensivos. O único método alternativo que possui uma precisão comparável com o antibiotograma é o método do Agar Overlay descrito por Barry, Garcia e Thrupp. Este método é uma alternativa aceitável para o teste de cepas como o *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae*, e *Pseudomonas aeruginosa*. O método não é aplicável para se testar outros microrganismos como os estreptococos e os *Haemophilus* sp.

O procedimento descrito abaixo é baseado no teste modificado e recomendado pelo CLSI.

## FINALIDADE

O produto SENSIDISC DME. Destina-se a determinar a sensibilidade ou resistência a agentes antimicrobianos de interesse clínico, seja para finalidade de diagnóstico ou de pesquisa.

## MODO DE USAR

1 - Preparar e esterilizar o meio Mueller Hinton Agar de acordo com as instruções do fabricante ou fundir o meio comprido pronto com o mínimo de aquecimento. Esfriar a 50°C e distribuir o meio em placas de Petri (aproximadamente 25 ml para placas de 90 mm e 60 ml para placas de 150 mm) de maneira a se obter uma superfície plana e uniforme com a profundidade de 4 mm. Evitar a formação de condensado na lâmpa e na superfície do meio distribuindo o meio a temperatura de 50°C. Deixar a tampa da placa entreeira até o endurecimento do meio. Para se operar com mais segurança realizar a operação preferencialmente em capela de fluxo laminar.

O pH final do meio de cultura deverá ser de  $7.3 \pm 0.2$  a 25°C.

2 - Remover os discos de sensibilidade do freezer ou da geladeira 15 minutos antes do início do teste e deixar a temperatura ambiente para minimizar a possibilidade de condensação de água nos discos.

3 - Preparar a turbidez padrão de Kirby e Bauer correspondente a 0,5 da escala de Mac Farland adicionando 0,5 ml de uma solução de BaCl<sub>2</sub> 0,048 M a 99,5 ml de uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,36N. Distribuir em volumes de 5 a 10 ml em tubos ou frascos lacrados e renovar a cada 6 meses, manter os tubos no escuro a temperatura ambiente.

4 - Transferir de 4 a 5 colônias isoladas para aproximadamente 5 ml de caldo Mueller Hinton, se a cultura em suspensão resultar em uma turbidez menor que turbidez padrão, incubar a cultura por 2 a 8 horas a 35-37°C até que se obtenha a turbidez padrão de Kirby e Bauer (0,5 da escala de Mac Farland). O inóculo também poderá ser obtido da suspensão direta das colônias em soro fisiológico estéril.

5 - Mergulhar um "swab" de algodão não tóxico, estéril. Remover o excesso de meio apertando e girando o "swab" contra as paredes internas do tubo.

6 - Inocular a superfície total da placa de Petri, semear em pelo menos 3 sentidos girando a placa em um ângulo de 60° após cada semeadura. Aplicar os discos de sensibilidade e incubar a 35-37°C por 18-24 horas. Após este período deve se observar crescimento confluinte de colônias.

## TRANSPORTE

A estabilidade dos discos de sensibilidade permanece inalterada por até 10 dias, em temperatura de até 30°C.

7 - Durante o ato da aplicação dos discos pressionar levemente cada disco de sensibilidade com uma pinça estéril de maneira a se assegurar o contacto com a superfície do agar. Observar um espaçamento mínimo de 24 mm para se evitar o "overlapping" dos halos de inibição.

8 - Medir os halos de inibição com um medidor em mm, incluindo o diâmetro dos discos. Colocar a placa de Petri a alguns centímetros de uma superfície escura, iluminando indiretamente, exceto para Linezolid, Oxacilina e Vancomicina que devem ser lidas com luz direta. Em placas de agar sangue remover a tampa e medir os halos. A zona de leitura dos halos deve ser definida como a área que não se observa crescimento visível a olho nu.

9 - Ignorar o véu de *Proteus* se os halos não estiverem claramente delineados.

10 - Medir as zonas de sulfonamidas na margem de crescimento mais intenso.

11 - O trimetoprim e as sulfonamidas se antagonizam e permitem um leve crescimento ao redor do halo; mede-se somente o halo óbvio a determinação do diâmetro da zona.

## Teste de sensibilidade para bactérias fastidiosas

### *Haemophilus influenzae*

1 - Preparar o meio HTM (Haemophilus Test Medium) enriquecido com Hemoglobina a 1% e Suplemento VX a 1%.

2 - Inóculo: Método de suspensão direta das colônias em soro fisiológico estéril, equivalente a uma solução padrão 0,5 Mac Farland.

3 - Semear o inóculo, aplicar os discos, incubar as placas a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e CO<sub>2</sub> a 5% de 16 a 18 horas. Examinar o crescimento.

4 - Em infecções críticas, testar a produção de beta-lactamases. Cepas com halos de inibição menores do que 20 mm com ampicilina ou penicilina G produzem beta-lactamases e não são considerados sensíveis a ampicilina.

### *Neisseria gonorrhoeae* produtoras de beta-lactamases

1 - Preparar o Meio de agar GC enriquecido com suplemento VX a 1%.

2 - Inóculo: método de suspensão direta das colônias em soro fisiológico estéril, equivalente a uma solução padrão 0,5 Mac Farland.

3 - Semear o inóculo, aplicar os discos, incubar as placas a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , e CO<sub>2</sub> a 5% de 20 a 24 horas. Examinar o crescimento.

4 - Halos de inibição menores do que 20 mm produzem beta-lactamase, cepas sensíveis têm zonas de 30 a 60 mm.

### *Streptococcus e Neisseria meningitidis*

1 - Preparar o Meio agar Mueller Hinton enriquecido com sangue desfibrinado de carneiro a 5%.

2 - Inóculo: método de suspensão direta das colônias em soro fisiológico estéril, equivalente a uma solução padrão 0,5 Mac Farland.

3 - Semear o inóculo, aplicar os discos, incubar as placas a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , e CO<sub>2</sub> a 5% de 20 a 24 horas. Examinar o crescimento.

## APRESENTAÇÃO:

Frasco com 50 discos de sensibilidade, sílica gel e indicador de umidade.

## CONSERVAÇÃO:

Manter os frascos na temperatura entre -20°C e +8°C.

Para os discos das famílias dos Beta-Lactâmicos e Carbapenemas, aconselha-se o armazenamento em freezer entre -20°C e -15°C.

Após abertura do frasco utilizar em um prazo máximo de 30 dias.

Validade: Vide frasco.

## INTERPRETAÇÃO DAS ZONAS DE INIBIÇÃO E CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

### Enterobactérias

Agente antimicrobiano	Potência dos discos e código	Zonas de Inibição em mm		CIM equivalente	
		Resistente	Intermediária	Sensível	Intermediária

#### PENICILINÍMICOS E INIBIDORES DE BETA LACTAMASES

Amoxicilina	AMO 10	SEGURO AMPICILINA			
Amoxicilina/Ácido Clavulânico	AMC 30	<13 14-17 >18	>32/16	16/8	<8/4
Ampicilina	AMP 10	<13 14-16 >17	>32	16	<8
Ampicilina/Sulbactam	APS 20	<11 12-14 >15	>32/16	16/8	<8/4
Piperacilina/Tazobactam	PIT 110	<17 18-20 >21	>128/4	32/4-64/4	<16/4
Ticarcilina/Ácido Clavulânico	TAC 85	<14 15-19 >20	>128/2	32/2-64/2	<16/2

\* 1

#### CEFALOSPORINAS

Cefaclor	CFC 30	<14 15-17 >18	>32	16	<8
Cefalotina	CFL 30	<14 15-17 >18	>32	16	<8
Cefazolina (Parenteral)	CFZ 30	<19 20-22 >23	>8	4	<2
Cefazolina (Oral)	CFZ 30	<14 >15	>32	-	<16
Cefepime * 2	CPM 30	<18 -	>25	16	<2
Cefotaxima	CTX 30	<22 23-25 >26	>4	2	<1
Cefotixima	CFO 30	<14 15-17 >18	>32	16	<8
Cefazidima	CAZ 30	<17 18-20 >21	>16	8	<4
Ceftriaxona	CRO 30	<19 20-22 >23	>4	2	<1
Cefuroxima (Parenteral)	CRX 30	<14 15-17 >18	>32	16	<8
Cefuroxima (Oral)	CRX 30	<14 15-22 >23	>32	8-16	<4

#### CARBAPENEMAS

Ertapenem	ERT 10	<18 19-21 >22	>2	1	<0.5
Imipenem	IPM 10	<19 20-22 >23	>4	2	<1
Meropenem	MPM 10	<19 20-22 >23	>4	2	<1

#### MONOBACTAN

Aztreonam	ATM 30	<17 18-20 >21	>16	8	<4
* 3					

#### AMINOGLICOSÍDEOS

Amicacina	AMI 30	<14 15-16 >17	>64	32	<16
Estreptomicina	EST 10	<11 12-14 >15	-	-	-
Gentamicina	GEN 10	<12 13-14 >15	>16	8	<4
Tobramicina	TOB 10	<12 13-14 >15	>16	8	<4

#### TETRACLÍCLINAS

Doxiciclina	DOX 30	<10 11-13 >14	>16	8	<4
Minociclina	MIN 30	<12 13-15 >16	>16	8	<4
Tetraciclina	TET 30	<11 12-14 >15	>16	8	<4

#### FLUOROQUINOLONAS e QUINOLONAS

Ciprofloxacina * 4	CIP 05	<15 16-20 >21	>4	2	<1
Ciprofloxacina * 5	CIP 05	<20 21-30 >31	>1	0,12-0,5	<0,06
Levofloxacina * 4	LEV 05	<13 14-16 >17	>8	4	<2
Levofloxacina * 5	LEV 05	-	>2	0,25-1	<0,12
Lomefloxacina	LOM 10	<18 19-21 >22	>8	4	<2
Norfloxacina	NOR 10	<12 13-16 >17	>16	8	<4
Ofoxacina * 4	OFX 05	<12 13-15 >16	>8	4	<2
Ofoxacina * 5	OFX 05	-	>2	0,25-1	<0,12
Ácido Pipemídico	PIP 20	<13 14-18 >19	-	-	-
Ácido Nalidíxico	NAL 30	<13 14-18 >19	>32	-	<16
Gatifloxacina	GAT 05	<14 15-17 >18	>8	4	<2

#### INIBIDORES DE FOLATO

Sulfametoxazol/Trimetoprim	SUT 25	<10 11-15 >16	>4/76	-	<2/38
Sulfonamidas	SUL 300	<12 13-16 >17	>512	-	<256
Trimetoprim	TRI 05	<10 11-15 >16	>16	-	<8

## FENICÓIS

Cloranfenicol	CLO 30	<12	13-17	>18	>32	16	<8
<b>FOSFOMICINAS</b>							
Fosfomicina	FOS 200	<12	13-15	>16	>256	128	<64
<b>NITROFURANTOÍNAS</b>							
Nitrofurantoina	NIT 300	<14	15-16	>17	>128	64	<32

## MACROLÍDEOS

Aztreomicina	AZI 15	<12	-	>32	-	<16
<b>NOTAS:</b>						
<b>* 1. CEFALOSPORINAS – (INCLUINDO – SE CEFALOSPORINA I, II, III e IV)</b>						

Para *Salmonella spp.* e *Shigella spp.* as cefalosporinas de primeira e segunda geração poderão apresentar sensibilidade "in vitro" porém, clinicamente isto não é verdade e não devem ser relatados como sensíveis. As cepas de *Klebsiella spp.* e *E. coli* que produzem ESBLs podem ser clinicamente resistentes a terapia com penicilínicos, cefalosporinas ou aztreomicina, mesmo que apresentem sensibilidade aos discos de antibiotograma. *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Serratia* podem desenvolver resistência a cefalosporinas de terceira geração. Portanto, as cepas isoladas, inicialmente sensíveis podem desenvolver resistência após 3 ou 4 dias de tratamento, sendo que, o antibiotograma deve ser repetido nos reisolamentos das culturas.

A CEFALOTINA pode ser usada para prever a atividade da cefapirina, cefradina, cefalexina, cefaclor e cefadroxil. A cefalotina (cefalosporina de terceira geração) pode ser testada individualmente, visto que algumas cepas podem ser sensíveis a estes antimicrobianos quando resistentes a cefalotina.

As Carbenemases estão sendo detectadas cada vez mais em isolados clínicos de *Enterobacteriaceae*, particularmente *K. pneumoniae*.

Os isolados clínicos das *Enterobacteriaceae* que possuem estas carbenemases podem ser resistentes à terapia com agentes carbenemáticos, apesar da sensibilidade aparente "in vitro", usando limites atualizados pelo CLSI.

\* 2 CEFEPIME-30µg (CPM 30) - SDD (Dose - Dependente - Susceptível) = 19mm-24mm para disco difusão. SDD para MIC = 4mm - 8mm

\* 3. Os aminoglicosídeos parecem apresentar sensibilidade para *Salmonella* e *Shigella spp.* "in vitro", porém não são efetivos clinicamente e por isto não devem ser relatados.

\* 4. Exceto para *Salmonella* spp.

\* 5. Utiliza-se estes parâmetros somente para *Salmonella* spp extra-intestinal (incluindo *S. typhi* e *S. paratyphi A-C*).

\* 6. Para isolados fecais de *Salmonella* e *Shigella spp.* o antibiotograma deve ser realizado somente com ampicilina, uma quinolona e sulfametoxazol/trimetoprim. No caso de isolar a *Salmonella* de fontes que não no sistema gastrointestinal deve-se testar o cloranfenicol e uma cefalosporina de terceira geração.

\* 7. Somente para *Salmonella typhi*, os critérios de interpretação são baseados no MIC.

## Pseudomonas aeruginosa

Agente antimicrobiano	Potência dos discos e código	Zonas de Inibição em mm		CIM equivalente	
		Resistente	Intermediária	Sensível	Intermediária