

SENSIDISC

Enterobacteriaceae

Agente antimicrobiano	Potência dos discos e código	Zonas de inibição em mm			CIM equivalente		
		Resistente	Intermediário	Sensível	Resistente mg/L	Intermediário	Sensível mg/L
PENICILÍNICOS							
Piperacilina/Tazobactam	PIT 30-6	< 17	17-19	≥ 20	> 16	16	≤ 8
CEFALOSPORINAS							
Cefotaxima	CTX 05	< 17	17-19	> 20	> 2	2	< 1
Ceftazidima	CAZ 10	< 19	19-21	≥ 22	> 4	2-4	≤ 1
NITROFURANTOÍNAS							
Nitrofurantoína (apenas ITU não complicada), <i>E. coli</i>	NIT 100	< 11	-	≥ 11	> 64	-	≤ 64

Pseudomonas aeruginosa

Agente antimicrobiano	Potência dos discos e código	Zonas de inibição em mm			CIM equivalente		
		Resistente	Intermediário	Sensível	Resistente mg/L	Intermediário	Sensível mg/L
PENICILÍNICOS							
Piperacilina/Tazobactam	PIT 30-6	< 18	-	≥ 18	> 16	-	≤ 16
CEFALOSPORINAS							
Ceftazidima	CAZ 10	< 17	-	≥ 17	> 8	-	≤ 8

Staphylococcus spp

Agente antimicrobiano	Potência dos discos e código	Zonas de inibição em mm			CIM equivalente		
		Resistente	Intermediário	Sensível	Resistente mg/L	Intermediário	Sensível mg/L
PENICILÍNICOS							
Benzilpenicilina, <i>S. aureus</i>	PEN 01	< 26 ^{1,2}	-	≥ 26 ^{1,2}	> 0,125	-	≤ 0,125
Benzilpenicilina, <i>S. lugdunensis</i>	PEN 01	< 26 ¹	-	≥ 26 ¹	> 0,125	-	≤ 0,125
Ampicilina, <i>S. saprophyticus</i>	AMP 02	< 18 ^{1,3}	-	≥ 18 ^{1,3}	-	-	-

1. Estafilococos são, em sua maioria, produtores de penicilinase, sendo resistentes a benzilpenicilina, fenoximetilpenicilina, ampicilina e amoxicilina. Isolados negativos para penicilinase e sensíveis a meticilina (oxacilina) podem ser reportados como sensíveis a esses agentes. Isolados positivos para penicilinase e sensíveis a meticilina são sensíveis às combinações com inibidor de β-lactamase e isoxazolipenicilinas (oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina e flucloxacilina).

Isolados resistentes à meticilina (oxacilina) são, com raras exceções, resistentes a todos os agentes β-lactâmicos.

2. Para detecção de isolados de *S. aureus* produtores de penicilinase, o método de disco-difusão é mais confiável do que pela determinação da CIM, desde que o diâmetro do halo seja medido e as bordas do halo sejam cuidadosamente avaliadas. Examine as bordas do halo de inibição com luz transmitida (placa contra a luz). Se o diâmetro do halo de inibição for <26mm, relatar resistente. Se o diâmetro for > 26mm e as bordas do halo bem definidas, relatar resistente. Se as bordas do halo forem mal definidas (difusas) relatar sensível, mas se duvidoso relatar resistente. Testes de β-lactamase com cefalosporina cromogênica não são confiáveis para detectar penicilinase estafilocócica.

3. *S. saprophyticus* sensíveis a ampicilina são gene *meCA*-negativo e sensíveis a ampicilina, amoxicilina e piperacilina com inibidor de β-lactamase

NITROFURANTOÍNAS

Nitrofurantoína (apenas ITU não complicada)	NIT 100	< 13	-	≥ 13	> 64	-	≤ 64
OXAZOLIDINONAS							
Linezolida	LNZ 10	< 21 ¹	-	≥ 21 ¹	> 4	-	≤ 4

1. Examine as margens do halo de inibição com luz transmitida (placa contra a luz).

Enterococcus spp

Agente antimicrobiano	Potência dos discos e código	Zonas de inibição em mm			CIM equivalente		
		Resistente	Intermediário	Sensível	Resistente mg/L	Intermediário	Sensível mg/L
PENICILÍNICOS							
Ampicilina	AMP 02	< 8	8-9	≥ 10	> 8	8	≤ 4
GLICOPEPTÍDEOS							
Vancomicina	VAN 05	< 12 ^{1,2}	-	≥ 12 ^{1,2}	> 4	-	≤ 4

1. Enterococos sensíveis à vancomicina apresentam halos de inibição com bordas bem definidas e não apresentam colônias dentro do halo de inibição. Examine as bordas dos halos de inibição com luz transmitida (placa erguida contra a luz) e suspeite de resistência quando as bordas forem mal definidas (irregulares ou difusas) ou quando houver crescimento de colônias dentro do halo de inibição, mesmo que o diâmetro do halo seja ≥ 12mm. Os isolados não podem ser reportados como sensíveis antes de 24h de incubação.

2. Resultados duvidosos devem ser confirmados por determinação da CIM e/ou detecção dos genes *van* por PCR.

AMINOGLICOSÍDEOS

Gentamicina	GEN 30	-	-	-	-	-	-
-------------	--------	---	---	---	---	---	---

1. A gentamicina pode ser utilizada para triagem de resistência de alto nível aos aminoglicosídeos.

Teste negativo: Isolados com CIM de gentamicina ≤ 128 mg/L ou com halo de inibição ≥ 8 mm. O isolado tem perfil selvagem para gentamicina e apresenta apenas resistência intrínseca de baixo nível. Para outros aminoglicosídeos isso pode não ser o caso. É provável o sinergismo com penicilinas ou glicopeptídeos se o isolado for sensível à penicilina ou a glicopeptídeo.

Teste Positivo: Isolados com CIM de gentamicina > 128 mg/L ou com halo de inibição < 8 mm. O isolado apresenta resistência a altos níveis de gentamicina e aos outros aminoglicosídeos, exceto à estreptomina, a qual deve ser testada separadamente caso indicado. Não ocorrerá sinergismo com penicilinas ou glicopeptídeos.

NITROFURANTOÍNAS

Nitrofurantoína (apenas ITU não complicada), <i>E. faecalis</i>	NIT 100	< 15	-	≥ 15	> 64	-	≤ 64
OXAZOLIDINONAS							
Linezolida	LNZ 10	< 19	-	≥ 19	> 4	-	≤ 4

Streptococcus dos grupos A, B, C e G

Agente antimicrobiano	Potência dos discos e código	Zonas de inibição em mm			CIM equivalente		
		Resistente	Intermediário	Sensível	Resistente mg/L	Intermediário	Sensível mg/L
PENICILÍNICOS							
Benzilpenicilina	PEN 01	< 18	-	≥ 18	> 0,25	-	≤ 0,25
GLICOPEPTÍDEOS							
Vancomicina	VAN 05	< 13	-	≥ 13	> 2	-	≤ 2
NITROFURANTOÍNAS							
Nitrofurantoína (apenas ITU não complicada), <i>Streptococcus agalactiae</i> (<i>Streptococcus</i> do grupo B)	NIT 100	< 15	-	≥ 15	> 64	-	≤ 64
OXAZOLIDINONAS							
Linezolida	LNZ 10	< 16	16-18	≥ 19	> 4	4	≤ 2

Streptococcus pneumoniae

Agente antimicrobiano	Potência dos discos e código	Zonas de inibição em mm			CIM equivalente		
		Resistente	Intermediário	Sensível	Resistente mg/L	Intermediário	Sensível mg/L
GLICOPEPTÍDEOS							
Vancomicina	VAN 05	< 16	-	≥ 16	> 2	-	≤ 2
OXAZOLIDINONAS							
Linezolida	LNZ 10	< 19	19-21	≥ 22	> 4	4	≤ 2

Streptococcus spp

(Grupo Viridans)

Agente antimicrobiano	Potência dos discos e código	Zonas de inibição em mm			CIM equivalente		
		Resistente	Intermediário	Sensível	Resistente mg/L	Intermediário	Sensível mg/L
PENICILÍNICOS							
Benzilpenicilina	PEN 01	< 12	12-17	≥ 18	> 2	0,5-2	≤ 0,25
Benzilpenicilina (triagem)	PEN 01	NOTA ¹	-	≥ 18 ¹	-	-	-
Ampicilina	AMP 02	< 15	15-20	≥ 21	> 2	1-2	≤ 0,5

1.O disco de benzilpenicilina de 1U pode ser utilizado para triagem de resistência aos β-lactâmicos em estreptococos do grupo viridans. Isolados classificados como não sensíveis devem ser testados frente a esses agentes individualmente.

CEFALOSPORINAS							
Cefotaxima	CTX 05	< 23 ¹	-	≥ 23 ¹	> 0,5	-	≤ 0,5

1.O disco de benzilpenicilina de 1U pode ser utilizado para triagem de resistência aos β-lactâmicos em estreptococos do grupo viridans.

Haemophilus influenzae

Agente antimicrobiano	Potência dos discos e código	Zonas de inibição em mm			CIM equivalente		
		Resistente	Intermediário	Sensível	Resistente mg/L	Intermediário	Sensível mg/L
PENICILÍNICOS							
Benzilpenicilina (triagem)	PEN 01	NOTA ¹	-	≥ 12 ¹	-	-	-
Ampicilina	AMP 02	< 16 ¹	-	≥ 16 ¹	> 1	-	≤ 1

1.O disco de benzilpenicilina 1U pode ser utilizado como triagem, mas não para distinguir entre isolados produtores de β-lactamase e isolados com mutações em PBP_s.

CEFALOSPORINAS							
Cefotaxima	CTX 05	< 27 ¹	-	≥ 27 ¹	> 0,125	-	≤ 0,125

1.O disco de benzilpenicilina de 1U pode ser utilizado para triagem de resistência aos β-lactâmicos.

TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

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 bula inclui uma série de recomendações que ajudarão a padronizar a realização dos testes. As recomendações do International Collaborative Study (ICS) e as proposições da Food and Drug Administration (FDA) foram revistas e as incorporamos a esta bula.

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 antibiograma recomendado pelo CLSI baseia-se no método originalmente descrito por Bauer et al. Este é o método mais exato para os quais foram desenvolvidos 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 antibiograma 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 *Streptococcus spp* e os *Haemophilus spp*. O procedimento descrito abaixo é baseado no teste modificado e recomendado pelo CLSI.

Materiais e métodos

1 - Preparar e esterilizar o meio Mueller Hinton agar de acordo com as instruções do fabricante ou fundir o meio comprado pronto com o mínimo de aquecimento. Esfriar a 50°C e distribuir o meio em placas de Petri (aproximadamente 25 ml para placas de 100 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 tampa e na superfície do meio distribuindo o meio a temperatura de 50°C. Deixar a tampa da placa entreaberta 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 +/- 0,1 a 25°C.

2 - Remover os discos de sensibilidade do freezer ou da geladeira 1 ou 2 horas 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 - Bauer correspondente a 0,5 da escala de Mac Farland adicionando 0,5 ml de uma solução de BaCl₂ 0,048 M a 99,5 ml de uma solução de H₂SO₄ 0,36N. Distribuir em volumes de 5 ml 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 a turbidez padrão, incubar a cultura por 2 a 8 horas entre 35°C a 37°C até que se obtenha a turbidez padrão de Kirby - Bauer.

5 - Mergulhar um swab de algodão não tóxico, de preferência esterilizado por radiação Gama, 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, semeando em pelo menos 3 sentidos girando a placa em um ângulo de 60°C após cada semeadura. Aplicar os discos de sensibilidade e incubar entre 35°C a 37°C por 18-24 horas. Após este período deve se observar crescimento confluyente de colônias.

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 o diâmetro total da zona de inibição em mm, incluindo o diâmetro do disco. Colocar a placa de Petri a alguns cm de uma superfície escura, iluminando indiretamente, exceto para Linezolid, Oxacilina, e Vancomicina que devem ser lidos com luz direta. O limite do halo de inibição deve ser definido até onde não tenha nenhum crescimento bacteriano óbvio. Ignorar o crescimento fraco das colônias minúsculas que só podem ser detectadas com lente de aumento.

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

10 - O Trimetoprim e as Sulfonamidas se antagonizam e permitem um leve crescimento ao redor do halo; mede-se somente o halo óbvio na 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, equivalente a uma solução padrão 0,5 de McFarland.

3- Incubação: 35°C ± 2°C, CO₂ a 5% de 16 a 18 horas.

Neisseria gonorrhoeae

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

2- Inóculo: Método de suspensão direta das colônias, equivalente a uma solução padrão 0,5 de McFarland.

3- Incubação: 35°C ± 2°C, CO₂ a 5% de 20 a 24 horas.

Streptococcus pneumoniae ou *Streptococcus spp*

1- Preparar o meio Agar Mueller-Hinton com 5% de sangue de carneiro.

2- Inóculo: Método de suspensão direta das colônias, equivalente a uma solução padrão 0,5 de McFarland.

3- Incubação: 35°C ± 2°C, CO₂ a 5% de 20 a 24 horas.

- Os resultados de sensibilidade para Ácido Nalidíxico, Nitrofurantoína, Sulfonamidas e Trimetoprim se aplicam somente aos microrganismos isolados em infecções do trato urinário.

- A Cefazolina pode ser usada para prever a atividade de antibacterianos orais como Cefaclor, Cefdinir, Cefpodoxime, Cefprozil, Cefuroxima, Cefalexinas e Loracarbef, quando utilizados em terapia de UTI. Cefdinir, Cefpodoxime e a Cefuroxime podem ser testados individualmente, visto que algumas cepas podem ser sensíveis a estes antimicrobianos quando resistentes a Cefazolina.

- O *Staphylococcus aureus* resistente à Oxacilina deve ser relatado como sendo resistente às cefalosporinas, cepas de *S. epidermidis* resistentes à Oxacilina também devem ser consideradas resistentes às cefalosporinas.

- O disco de Clindamicina deve ser usado para interpretar o disco de Lincomicina.

- O disco de Penicilina G deve ser usado no teste da sensibilidade de todas as penicilinas sensíveis à penicilinase (Ampicilina, Amoxicilina). Os resultados que caírem na categoria Intermediária devem ser relatados como resistentes, visto que podem ser cepas produtoras de penase. No caso de teste da Penicilina G contra enterococos e outros bacilos Gram negativos a categoria Intermediária refere-se a altas dosagens de Benzilpenicilina por via parenteral.

- O disco de Sulfonamida de 300 µg deve ser testado preferencialmente em Meio Mueller Hinton Agar, visto que o sangue lisado pode inibir a formação do halo; o meio MHM deve ser também livre de timidina.

- Organismos que são sensíveis à Tetraciclina também são considerados sensíveis à Doxiciclina e Minociclina. Entretanto, alguns organismos que são intermediários ou resistentes à tetraciclina podem ser sensíveis à Doxiciclina ou Minociclina ou a ambos.

Normas de segurança / precauções técnicas

Os laboratórios de microbiologia devem atuar sob a égide de normas, para a garantia da segurança dos envolvidos direta e indiretamente. É necessário o manual de Boas Práticas (BPL) para cada setor de Microbiologia visando estabelecer tais prudências:

1. Procedimentos laboratoriais que envolvem materiais biológicos devem ser realizados somente por profissionais qualificados ou por técnicos supervisionados.
2. O fluxo laminar (Capela) é necessário para proteção ante materiais potencialmente infecciosos e garantia da confiabilidade dos resultados.
3. Utilização de Equipamentos de Proteção Individual (EPIs) como barreiras de segurança.
4. Utilização de pipetadores e seus acessórios, descartando-se a possibilidade de qualquer pipetagem com a boca.
5. Numa eventual contaminação, lavar o local com soluções bactericidas utilizadas normalmente: Álcool etílico ou Isopropílico (65% a 85%), compostos quaternários de Amônio ou Fenol de 0,5% a 5%. Retirar as luvas e proceder da mesma maneira.
6. As amostras devem ser transportadas em recipientes apropriados e em condições adequadas.
7. Restringir o uso de seringas ou agulhas somente ao necessário.
8. Equipamentos contaminados: proceder cuidadosa descontaminação de seu reparo e transporte.
9. O material de uso na Microbiologia deve ser autoclavado a 121°C por 30 minutos.

Descarte do material

O descarte deve ser realizado conforme as recomendações vigentes da ANVISA (RDC nº 306, 07/12/2004, D.O.U. 10/12/2004) e do CONAMA (Resolução 28/03/2008)

Referências Bibliográficas

BrcAST 2018