

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 Internacional Collaborative Study (ICS) e as proposições da Food and Drug Administration (FDA) foram revistas e os 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 estreptococos e os *Haemophilus sp.* 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.
- 2 - O pH final do meio de cultura deverá ser de 7,3 +/- 0,1 a 25°C.
- 3 - 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.
- 4 - 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 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.
- 5 - 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 e Bauer.
- 6 - 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.
- 7 - Inocular a superfície total da placa de Petri, semeando em pelo menos 3 sentidos girando a placa em um ângulo de 60° após cada sementeira. Aplicar os discos de sensibilidade e incubar entre 35°C a 37°C por 18-24 horas. Após este período deve se observar crescimento confluinte de colônias.
- 8 - 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.
- 9 - 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 lido 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.
- 10 - Ignorar o véu de Proteus se os halos não estiverem claramente delineados.
- 11 - 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.

S. 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, Nitrofurantoina, 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, cefuroxime, 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 deve ser considerado resistente 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)



DIAGNÓSTICOS MICROBIOLÓGICOS ESPECIALIZADOS

Av. Antonio Cavasana, 97 - B. Concórdia III

CEP 16013-385 - Araçatuba/SP

Telefax: (18) 3621-8670 / 3621-8836

comercial@dme.ind.br - www.dme.ind.br

CNPJ: 65.013.120/0001-79

Resp. Técnico: Antonio C. De Fendi - CRBM 1005

Registro MS 10401600019

POLISENSIDISC 12

APRESENTAÇÃO

Caixa contendo 25 unidades de Polisenidisc, cada unidade composta de 12 antimicrobianos específicos para cada série.

PRINCÍPIO

Sistema Polisenidisc composto de um módulo circular, contendo em seu anel externo 09 antimicrobianos e anel interno 03 antimicrobianos, totalizando 12 antimicrobianos para cada série.

POLISENSIDISC DME é para ser usado em placas de Petri de 150 mm de diâmetro por 20 mm de altura.

Enterobacterales urinário (EU)

Halos de inibição em mm

Antibacteriano	Código/ Potência µg	Resistente	Intermediário	Sensível
Ácido Nalidíxico	NAL 30	≤ 13	14-18	≥ 19
Amicacina	AMI 30	≤ 14	15-16	≥ 17
Amoxicilina/Ac. Clavulânico	AMC 30 (20/10)	≤ 13	14-17	≥ 18
Ampicilina	AMP 10	≤ 13	14-16	≥ 17
Cefazolina parenteral para <i>Enterobacterales</i>	CFZ 30	≤ 19	20-22	≥ 23
Cefazolina oral para <i>Enterobacterales</i>		≤ 14	-	≥ 15
Cefepime ¹	CPM 30	≤ 18	-	≥ 25
Ceftriaxona	CRO 30	≤ 19	20-22	≥ 23
Ciprofloxacina	CIP 05			
Para <i>Enterobacterales</i>		≤ 21	22-25	≥ 26
Para <i>Salmonella spp</i>		≤ 20	21-30	≥ 31
Gentamicina	GEN 10	≤ 12	13-14	≥ 15
Nitrofurantoina	NIT 300	≤ 14	15-16	≥ 17
Norfloxacina	NOR 10	≤ 12	13-16	≥ 17
Sulfazotrim	SUT 25	≤ 10	11-15	≥ 16

¹ Cefepime - 30µg (CPM 30) – SDD (Dose – Dependente - Susceptível) = 19 mm – 24 mm.

CONSERVAÇÃO

Manter ao abrigo da luz, conservar de -15°C a -20°C.

Obs.: Os módulos deverão ser abertos no momento do uso.

TRANSPORTE

A estabilidade do Polisenidisc permanece inalterada por até 10 dias, em temperatura de até 30°C.

Lote e Validade: Vide caixa.

Referências Bibliográficas

* Referências CLSI 2020.