

# Métodos laboratoriais para teste de susceptibilidade antimicrobiana (TSA) para *Vibrio cholerae*: pontos de especial atenção

Este documento discute alguns pontos críticos relativos aos procedimentos laboratoriais para teste fenotípico de susceptibilidade antimicrobiana por métodos de difusão, utilizando discos impregnados com antibióticos (método de Kirby-Bauer) e tiras de teste, conforme apresentado no Job Aid "[Teste de susceptibilidade antimicrobiana para o tratamento e controle da cólera](#)". Existem outros métodos para essa detecção fenotípica, incluindo métodos de diluição como a microdiluição em caldo e a diluição em ágar, mas estes são mais caros e difíceis de implementar, portanto, geralmente não são recomendados pelo GTFCC.

Os protocolos padrão para teste de susceptibilidade antimicrobiana são descritos detalhadamente nas diretrizes e referências do Antibiograma (CLSI\*, EUCAST\*\*, CA-SFM EUCAST\*\*\*).

**Conformidade com a segurança.** Testes de *Vibrio cholerae* e outros espécimes potencialmente infecciosos devem ser sempre realizados de acordo com as políticas e procedimentos de segurança laboratorial. Equipamentos de proteção individual (EPI) devem ser usados ao manipular materiais potencialmente infecciosos. Consulte sempre os formulários individuais das FDS (fichas de dados de segurança) para informações específicas sobre os reagentes.

**Cepas de Controle de Qualidade (CQ).** De acordo com as diretrizes e referências do Antibiograma<sup>1,2,3</sup>, para monitorar o sistema de TSA e garantir resultados precisos e reproduzíveis, cepas de CQ devem ser incluídas e processadas sempre em paralelo as cepas de teste. A seleção das cepas de CQ é baseada no que é recomendado para avaliar cada medicamento em teste, veja abaixo. No entanto, outras cepas de laboratório disponíveis, cuidadosamente caracterizadas e com susceptibilidade conhecida aos agentes antimicrobianos testados, podem ser utilizadas.

Azitromicina (CIM) *S. aureus* ATCC 29213

Eritromicina (diâmetro) *S. aureus* ATCC 29213

Pefloxacina (diâmetro) *E. coli* ATCC 25922

Ciprofloxacina (CIM) *E. coli* ATCC 25922

Tetraciclina (diâmetro) *E. coli* ATCC 25922

Doxiciclina (CIM) *E. coli* ATCC 25922

**Qualidade e preparação do Meio.** O meio de cultivo ágar Mueller-Hinton é o único teste de susceptibilidade validado por diretrizes internacionais (1,2,3). Recomenda-se a utilização de meio Mueller-Hinton comercial desidratado ou pronto para uso. O ágar deve ser distribuído em placas de Petri de vidro ou plástico, de fundo plano, em uma superfície nivelada, a uma profundidade uniforme de 4 mm ± 0,5 mm. **Profundidades maiores ou menores afetam a difusão dos agentes antimicrobianos e a atividade do medicamento pode ser afetada.**

Cada novo lote de meio deve ser testado quanto à esterilidade, capacidade de favorecer o crescimento do(s) patógeno(s) alvo(s), capacidade de produzir um padrão apropriado de antibioresistência com a cepa controle. Armazene as placas de Petri vertidas a 4–8 °C de acordo com as instruções do fabricante. A superfície do ágar deve estar seca antes do uso, mas tenha cuidado para não secar excessivamente o ágar.

**Preparação do inóculo.** O antibiograma deve ser realizado **utilizando uma cepa recém-subcultivada** (18 ± 2 horas a 35 °C ± 2 °C) em meios não seletivos adequados, como Ágar Mueller Hinton, Ágar Infusão Cérebro-Coração (BHI) ou Ágar Tripton de Soja (TSA), inoculados de forma a obter colônias isoladas. Também faça estrias das cepas de CQ ATCC necessárias para testes de difusão em disco, e incube da mesma maneira. Faça uma suspensão bacteriana em solução salina a partir de várias colônias isoladas (para evitar a seleção de uma variante atípica) de modo a obter a turbidez padrão equivalente a 0,5 da escala de McFarland. Ajuste a densidade adicionando solução salina ou bactérias, conforme necessidade.

**Inoculação das placas de ágar.** O inóculo bacteriano deve ser utilizado preferencialmente 15 minutos após a preparação, e no máximo em até 60 minutos. Mergulhe uma haste de algodão estéril na suspensão bacteriana e remova o excesso de líquido girando a haste nas paredes do tubo. Se várias placas de ágar forem inoculadas com o mesmo inóculo, é necessário repetir o procedimento citado anteriormente entre cada placa de ágar. Faça estrias em toda a superfície da placa 3 vezes, girando 60 graus a cada vez, garantindo que não haja lacunas entre as estrias. **Discos ou tiras de teste devem ser depositados dentro de 15 minutos após a inoculação.** Se as placas forem deixadas por muito tempo em temperatura ambiente antes de depositar os discos ou tiras, as bactérias podem começar a crescer, levando a uma diminuição falsa no tamanho das zonas de inibição.

\* Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais

\*\* Comitê Europeu de Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana (<http://www.eucast.org>)

\*\*\* Comitê de Antibiograma da Sociedade Francesa de Microbiologia - Comitê Europeu de Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana

**Discos antimicrobianos.** Refrigere os recipientes contendo os discos a  $\leq 8$  °C ou congele a  $\leq -14$  °C em um freezer não auto-descongelante até o uso, de acordo com as recomendações do fabricante. Para evitar condensação, permita que os discos ou recipientes dosadores retornem à temperatura ambiente antes do uso. Use um dispensador de discos; se não estiver disponível, encontre um recipiente estéril, como uma placa de Petri vazia, para colocar os discos e use pinças estéreis para manipulá-los (1). Use no máximo seis discos se estiver usando placas de ágar pequenas (90 ou 100 mm). Coloque os discos firmemente na superfície do ágar seco e inoculado. **Uma vez que os discos tenham sido colocados, eles não devem ser movidos, pois a difusão do antibiótico é muito rápida.**

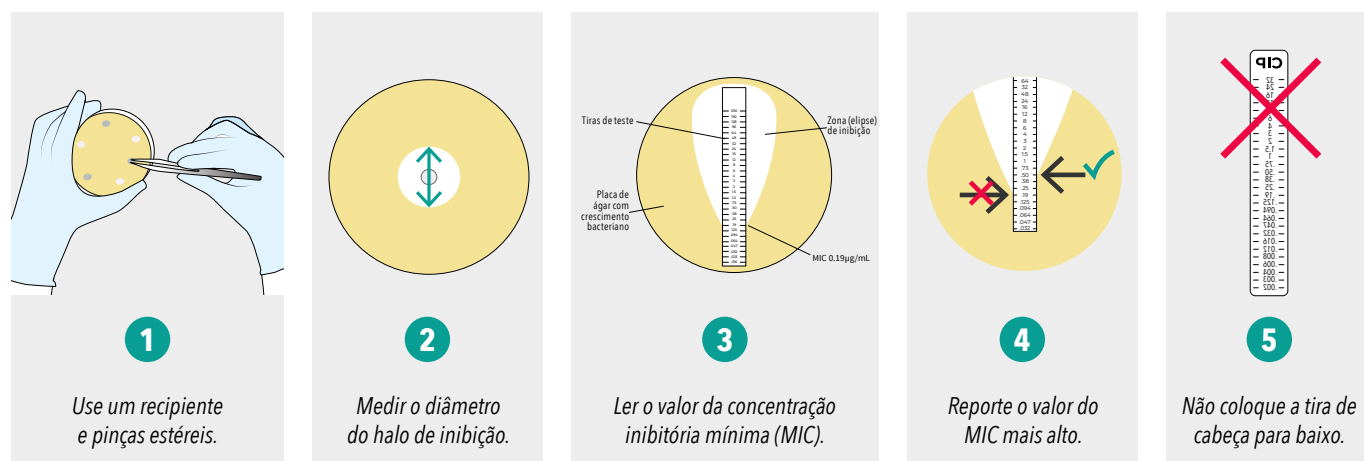
**Tiras de teste.** Permita que os recipientes de tiras retornem à temperatura ambiente, aproximadamente 30 minutos antes do uso. Remova o número suficiente de tiras de teste da embalagem, manualmente ou utilizando pinças. Manipule apenas a tira acima da linha preta na área onde o código do antibiótico é mostrado. Não toque na superfície da tira oposta à escala da concentração inibitória mínima (MIC). Uma vez que as tiras são colocadas, sob o inóculo, elas devem permanecer no lugar. **As tiras não podem ser movidas devido à liberação instantânea de antibiótico no ágar.**

**Incubação.** Incube as placas em posição invertida a  $35 \pm 2$  °C por  $18 \pm 2$  horas, não empilhe mais do que cinco placas. A incubação deve ocorrer, preferencialmente, dentro de 15 minutos após a deposição dos discos e no máximo em 30 minutos.

**Leitura.** O inóculo correto deve resultar em crescimento bacteriano confluyente por toda a superfície do ágar. A presença de colônias isoladas indica que o inóculo está muito baixo e o teste deve ser repetido. Após o período de incubação, meça o diâmetro dos halos de inibição (incluindo o disco) até o milímetro mais próximo usando um paquímetro ou uma régua colocada na parte de trás da placa (2). Verifique se os diâmetros dos halos de inibição das cepas de controle de qualidade estão dentro dos limites aceitáveis. Consulte as do Antibiograma<sup>3,4,5</sup> para interpretação. Os padrões são revisados regularmente, por favor, verifique se está utilizando uma versão atualizada.

Leia o valor de MIC onde a borda da elipse de inibição intersecta o lado da tira (3); se a elipse intersectar entre dois valores de MIC, o valor mais alto dos dois é relatado (4); se a tira foi colocada de cabeça para baixo, é um resultado inválido, repita o teste (5).

**Solução de problemas.** Testes de CQ fora do alcance muitas vezes são devido à contaminação ou ao uso de uma cepa de controle de qualidade (CQ) incorreta. A ação corretiva deve incluir primeiro repetir o teste com uma cultura pura de uma cepa de CQ recém-subcultivada. Se o problema não for resolvido, consulte as diretrizes do Antibiograma e o guia referência de solução de problemas (CLSI M100<sup>1</sup>) ou Perguntas Frequentes (Eucast<sup>4</sup>). De acordo com o guia de leitura do EUCAST para difusão em disco<sup>6</sup>, em caso de colônias distintas dentro de uma zona de inibição, verifique a pureza e repita o teste, se necessário. Se as culturas forem puras, as colônias dentro das zonas devem ser levadas em conta ao medir o diâmetro. Em caso de zonas duplas, verifique a pureza e repita o teste, se necessário. Se as culturas forem puras, leia a zona interna.



## Referencias

- <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>, CLSI M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 34th Edition
- [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Disk\\_test\\_documents/2024\\_manuals/Manual\\_v\\_12.0\\_EUCAST\\_Disk\\_Test\\_2024.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2024_manuals/Manual_v_12.0_EUCAST_Disk_Test_2024.pdf)
- [https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2023/06/CASFM2023\\_V1.0.pdf](https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2023/06/CASFM2023_V1.0.pdf)
- [https://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints](https://www.eucast.org/clinical_breakpoints)
- [https://clsi.org/all-free-resources/\(CLSI\\_M45\\_ED3:2016TABLE\\_20\)](https://clsi.org/all-free-resources/(CLSI_M45_ED3:2016TABLE_20))
- [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Disk\\_test\\_documents/2023\\_manuals/Reading\\_guide\\_v\\_10.0\\_EUCAST\\_Disk\\_Test\\_2023.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2023_manuals/Reading_guide_v_10.0_EUCAST_Disk_Test_2023.pdf)