

Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana para o Tratamento e Controle da Cólera

OBJETIVO: Fornecer instruções para determinar a suscetibilidade *in vitro* do *Vibrio cholerae* O1/O139

MÉTODOS

Combinação de dois métodos:

- Método de difusão em ágar com discos impregnados com antibióticos em concentrações predeterminadas.
- Medição da concentração inibitória mínima (CIM) usando tiras de teste impregnadas com um gradiente de concentrações pré-definidas de antibióticos.

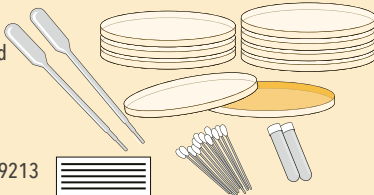
NOTA: Tiras de teste são recomendadas para antibióticos para os quais nenhum ponto de corte está definido ou quando testes complementares são necessários.

NOTA: Cepa(s) de controle devem sempre ser preparadas em paralelo com as cepas de teste.

MATERIAIS NECESSÁRIOS

- Placas de Ágar Mueller Hinton (MHA) (com profundidade de 4mm ± 0,5mm)
- Solução salina estéril (0,85% ou 0,9%) + tubos de ensaio de tamanho idêntico para uso no preparo das suspensões bacterianas e o padrão de turbidez de McFarland
- Hastes estéreis com ponta de algodão
- Dispensador automático de discos ou molde com padrão de espaçamento de 5 ou 6 discos e pinças esterilizadas

- Régua métrica (que possa medir em mm)
- Suspensão padronizada na escala 0,5 de McFarland
- Folha de papel branca com linhas pretas nítidas (pode ser preparada à mão ou impressa)
- Cepas de controle: *Escherichia coli* ATCC25922
Staphylococcus aureus ATCC29213



Antibiótico a ser testado e método recomendado:

Teste inicial de triagem por disco-difusão

- Eritromicina (EM), (15mg)
- Pefloxacina (PEF), (5µg)
- Tetraciclina (TE), (30µg)

Teste de confirmação por medição da CIM

- Azitromicina (AZ)
- Ciprofloxacino (CIP)
- Doxiciclina (DO)

AZ, CIP e DOX são os três antibióticos recomendados para o tratamento da cólera de acordo com a GTCC: <https://www.gtcc.org/wp-content/uploads/2024/12/gtcc-technical-note-on-use-of-antibiotics-for-the-treatment-of-cholera-1.pdf>

- Armazene os discos e tiras de teste de antibióticos entre -20°C e 8°C de acordo com as instruções do fabricante.
- Verifique a data de validade dos discos e tiras de teste de antibióticos antes do uso.

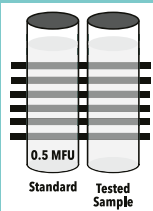
PROCEDIMENTO PARA TESTE COM DISCOS E TIRAS

1. Preparação do inóculo

Prepare uma suspensão bacteriana em solução salina estéril ajustada para 0,5 McFarland* por comparação com o padrão, utilizando algumas colônias bem isoladas de uma cultura em ágar overnight (18-24 horas a 35 ± 2°C).

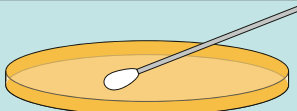
NOTA: Certifique-se de que o Padrão está aliqotado em um tubo do mesmo tamanho que o tubo usado para preparar a suspensão de teste.

*correspondendo a um inóculo de aproximadamente 1 a 2 x 10⁸ UFC/mL (Absorbância 600nm = 0,08-0,1).



2. Inoculação do Ágar Mueller Hinton (MHA)

- No máximo em 15 minutos após preparar a suspensão do inóculo.
- Mergulhe a haste de algodão estéril na suspensão bacteriana; remova o excesso de líquido pressionando a haste contra a parede interna do tubo.
- Esfregue toda a superfície da placa 3 vezes, girando 60 graus a cada vez.
- Garanta que a superfície esteja completamente seca antes do próximo passo.



3. Aplicação dos discos de antibióticos

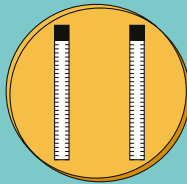
- No máximo em 15 minutos após a semeadura.
- Coloque os discos individualmente com um dispensador automático de discos ou pinças estéreis, pressionando suavemente sobre o ágar.
- Após depositados, não mova os discos.
- Recoloque a tampa, inverta as placas e coloque na incubadora.



NOTA: Permita que os discos alcancem a temperatura ambiente antes de abrir o cartucho ou embalagem de armazenamento.

4. Aplicação das tiras de teste

- No máximo em 15 minutos após a semeadura.
- Coloque as tiras no ágar de acordo com as recomendações do fabricante.
- Após depositados, não mova as tiras.
- Recoloque a tampa, inverta as placas e coloque na incubadora.



NOTA: As tiras de teste devem ser armazenadas continuamente em um congelador a -20°C. Permita que as tiras que serão usadas alcancem a temperatura ambiente antes de colocá-las no ágar.

5. Incubação: 18 ± 2 horas a 35°C ± 2°C.

6. Leitura: Após 18 ± 2 horas, observe a placa e meça o diâmetro (mm) do halo de inibição. Leia o valor da CIM (em µg/mL) no local de interseção entre a borda da elipse de inibição e a tira do teste. Se houver diferença entre os valores de CIM entre os dois lados da fita, sempre considere o valor mais alto.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

- Controle de Qualidade: se os resultados das cepas de controle forem inesperados ou estiverem fora do intervalo, quaisquer resultados em cepas de *V. cholerae* são inválidos e o laboratório deve investigar a fonte do erro.
 - Tetraciclina: teste de triagem para sensibilidade à doxiciclina. Cepas sensíveis a TE podem ser categorizadas como "sensíveis" à doxiciclina. De acordo com o CA-SFM/EUCAST, se TE for resistente, a doxiciclina deve ser testada individualmente por medição de CIM.
 - Pefloxacina: teste de triagem para sensibilidade à ciprofloxacina.
 - Eritromicina: teste de triagem para sensibilidade à azitromicina.
- NOTA:** A medição da CIM para AZ e CIP não é necessária para o manejo de casos, mas é recomendada para vigilância epidemiológica das cepas.

NOTA 1: O teste de difusão em disco com ácido nalidíxico mostrou-se um método confiável para identificar cepas de *V. cholerae* O1 com suscetibilidade diminuída ou resistência à ciprofloxacina, e pode ser usado como uma alternativa ao teste de triagem PEF. Se resistente ao NA (com base em critérios interpretativos para *Enterobacteriaceae*), o isolado deve ser testado quanto à susceptibilidade ao CIP por medição da CIM. Cepas que apresentarem crescimento até o contato com o disco de NA devem ser consideradas resistentes ao CIP (CIM ≥ 0,25mg/L).

NOTA 2: Antibióticos adicionais podem ser testados para monitoramento epidemiológico de cepas (ou seja, colistina, polimixina B, ampicilina, cloranfenicol, trimetoprima/sulfametoxazol, cefalosporinas de 1ª e 3ª gerações, estreptomicina).

INTERPRETAÇÃO: por favor, consulte seguintes normas:

CLSI: <https://clsi.org/all-free-resources/>, CLSI M45 ED3:2016, Tabela 20. *Vibrio* spp. (Incluindo *Vibrio cholerae*)

EUCAST: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints

CA-SFM / EUCAST: https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2023/06/CASFM2023_V1.0.pdf

NOTA: As normas são revisadas regularmente, por favor verifique se você está usando uma versão atualizada.

Este documento destina-se ao uso por Laboratórios de Referência. Por favor, mantenha o isolado até que os testes estejam completos ou de acordo com a política de guarda de amostras do laboratório.