

Instruções de Utilização de NEO-SENSITABS™

Revisão
Data de Emissão
Língua

DBV0004F
12.04.2013
Português

NEO-SENSITABS™

Testes de sensibilidade antimicrobiana

Fabricante

Rosco Diagnostica A/S, Taastrupgaardsvej 30, DK-2630 Taastrup, Dinamarca, www.rosco.dk

Utilização a que se destina

Neo-Sensitabs são comprimidos utilizados para testes de sensibilidade *in vitro* semi-quantitativos, pelo método de teste de comprimidos em ágar/difusão, de organismos não fastidiosos frequentes de crescimento rápido, certos agentes patogénicos bacterianos fastidiosos e leveduras.

Princípios do método

Os Neo-Sensitabs contendo uma variedade de agentes antimicrobianos são aplicados na superfície de um meio de cultura de ágar adequado, que foi inoculado com uma cultura pura de isolados clínicos.

O organismo não fastidioso, que inclui *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Enterococcus* spp. e *Vibrio cholerae*, pode ser testado num meio de cultura sem sangue ou outro suplemento como, por exemplo, ágar Mueller Hinton II (MH). O *Haemophilus influenzae* requer um meio de cultura de teste de Haemophilus (HTM), o *Neisseria gonorrhoeae* requer uma base ágar GC (GCA), o *Streptococcus pneumoniae* e outros estreptococos requerem ágar Mueller Hinton II + sangue a 5 % (MH+B). A levedura deve ser testada em ágar RPMI-1640 ou ágar shadomy modificado e os anaeróbios requerem métodos especiais.^{1,2}

Após a incubação, as placas são examinadas e os diâmetros das zonas de inibição em volta dos comprimidos são medidos e comparados com as tabelas de interpretação das zonas de cada antibiótico a fim de determinar o(s) agente(s) mais indicados para utilização na terapêutica antimicrobiana.

Os Neo-Sensitabs são normalizados de acordo com os limites das concentrações mínimas inibitórias (MIC) recomendados pelo CLSI (NCCLS).^{3,4} e EUCAST. Além disso, os Neo-Sensitabs são ajustados aos limites MIC recomendados por "Grupos de Normalização dos Testes de Sensibilidade" em França e Reino Unido. Os critérios de interpretação dos diâmetros das zonas para os diferentes países encontram-se no Guia do Utilizador dos Neo-Sensitabs (www.rosco.dk).¹

Reagentes

Os Neo-Sensitabs são comprimidos de 9 mm contendo antimicrobianos cristalinos cuidadosamente misturados com um granulado protector. Os comprimidos são impressos em ambos os lados com um código exclusivo de 5 caracteres. Os Neo-Sensitabs são apresentados em cartuchos contendo cada um 50 comprimidos. Os cartuchos podem ser utilizados com um dispensador de Neo-Sensitabs. Os dispensadores fornecem 7, 9, 12 ou 16 Neo-Sensitabs de cada vez e, uma vez que os comprimidos têm a sua própria pressão em relação ao meio, não é necessário exercer qualquer pressão adicional nos comprimidos.

Instruções de conservação

- 1) Após recepção, verifique o símbolo da temperatura no recipiente exterior. Os Neo-Sensitabs com um símbolo de 2 °C a 8 °C devem ser conservados num frigorífico e os Neo-Sensitabs com um símbolo de 25 °C como temperatura máxima no recipiente exterior devem ser conservados à temperatura ambiente.
- 2) Se os Neo-Sensitabs forem conservados no frigorífico, deixe o cartucho atingir a temperatura ambiente antes de ser aberto, ou seja, aguarde 30 a 60 minutos, para evitar a condensação de água nos comprimidos.

- 3) Os Neo-Sensitabs com o símbolo de temperatura de 2 °C a 8 °C podem ficar à temperatura ambiente durante 2 meses, sem perda de actividade essencial.
- 4) Os cartuchos abertos colocados num dispensador devem ser utilizados no prazo de 2 meses para os Neo-Sensitabs com o símbolo de temperatura de 2 °C a 8 °C, e no prazo de 12 meses para os Neo-Sensitabs com o símbolo de temperatura inferior a 25 °C.

O prazo de validade nos cartuchos aplica-se apenas a cartuchos com tampas conservados à temperatura correcta.

Precauções

Cumprir as instruções de utilização. O desempenho dos Neo-Sensitabs depende não só da potência dos comprimidos mas também da utilização do inóculo e das placas de ágar correctos, da temperatura de incubação, da interpretação correcta do diâmetro das zonas, da conservação correcta dos Neo-Sensitabs e da utilização de culturas de controlo.⁵

Amostra

A amostra deve ser perfeitamente típica do local da infecção, ou seja, devem fazer-se todos os esforços para obter uma amostra representativa da bactéria patogénica relevante. Ver instruções, que incluem a preparação do inóculo.

MÉTODO

Materiais fornecidos: Neo-Sensitabs de acordo com a rotulagem.

Materiais necessários mas não fornecidos: Meios de cultura, reagentes, organismos de controlo de qualidade e equipamento de laboratório necessário para realizar o teste de sensibilidade de difusão em ágar por um método normalizado. Prepare um padrão de turvação da escala 0,5 de McFarland adicionando 0,5 mL de 0,048 M BaCl₂ (1,175 % p/v BaCl₂·2H₂O) a 99,5 mL de 0,18 M H₂SO₄ (1% (v/v)) mexendo constantemente. Em alternativa, é possível adquirir um padrão já preparado. Verifique utilizando um espectrofotómetro com uma trajectória da luz de 1 cm e uma cuvete correspondente; a absorvência a 625 nm deverá ser de 0,08 a 0,10.^{3,4}

I. Instruções de utilização/Bactéria

I.1. Normalização do inóculo de acordo com o CLSI (NCCLS)³ e EUCAST

Método de suspensão directa das colónias:

Suspendendo várias colónias morfológicamente semelhantes de uma placa de ágar de 18-24 h (não selectiva) em 4-5 mL de solução de NaCl a 0,9 %, é possível desenvolver uma turvação equivalente ao padrão do BaSO₄ (0,5 da escala de McFarland). O método é equivalente ao método normalizado do CLSI (NCCLS) e requer menos tempo. A abordagem é recomendada para os testes de organismos fastidiosos como *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae*, *Moraxella catarrhalis*, pneumococos/estreptococos e para os testes de estafilococos relativamente à potencial resistência à metilina ou à oxacilina.³

I.2. Inoculação

- a) Nos 15 minutos seguintes, introduza uma compressa de algodão esterilizada na suspensão ajustada e retire o inóculo da compressa exercendo uma pressão firme sobre o interior do tubo.
- b) Nos 15 minutos seguintes as compressas são utilizadas para inocular as placas de teste.
- c) Inocule a superfície seca da placa de ágar apropriada passando a compressa sobre toda a superfície. Deixe a superfície secar 3 a 5 minutos ou, no máximo, 15 minutos antes de aplicar Neo-Sensitabs ao meio de cultura.
- d) Selecione os comprimidos apropriados, por exemplo, conforme recomendado pelo CLSI (NCCLS).⁶ Não utilize mais do que nove Neo-Sensitabs por placa de 150 mm ou quatro Neo-Sensitabs por placa de 100 mm quando estiver a testar *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae* e *Streptococcus* spp..

I.3. Incubação e leitura das placas

- a) Nos 15 minutos seguintes, coloque o lado com ágar voltado para cima numa incubadora a 35 °C. O *Haemophilus* spp., o *N. gonorrhoeae*, o *S. pneumoniae* e outros estreptococos devem ser incubados numa atmosfera enriquecida com CO₂ a 5 %.
- b) Examine as placas após 16 a 18 horas de incubação (20 a 24 h para *N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae* e outros estreptococos). Recomenda-se uma incubação de 24 horas completas para a detecção de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina. Mantenha a placa voltada para cima para a luz transmitida e examine as zonas de oxacilina e vancomicina quanto ao crescimento ligeiro (colónias minúsculas) de colónias resistentes à meticilina ou à vancomicina, respectivamente, dentro de zonas de inibição aparentes. Qualquer crescimento discernível dentro da zona de inibição indica resistência à meticilina ou à vancomicina. As bordas das zonas de inibição contêm um grande número de pequenas colónias quando se utiliza trimetoprim, sulfonamidas e comprimidos de trimetoprim + sulfametoxazol. Neste caso, as zonas de inibição são medidas até às colónias de dimensões normais (ignore o crescimento ligeiro e meça a margem mais óbvia). Para mais pormenores, leia o Guia do Utilizador dos Neo-Sensitabs (www.rosco.dk).¹
- c) Os diâmetros das zonas de inibição completa são medidos conforme determinado por inspeção visual grosseira. As zonas são medidas até ao milímetro inteiro mais próximo.

II. Instruções de utilização/Leveduras

II.1. Preparação do inóculo

O inóculo deve resultar apenas num crescimento confluyente. Para a maioria das estirpes, o inóculo deve conter aproximadamente 5x10⁵CFU/ mL (escala 0,5 de McFarland diluído 1+1 com solução salina). Para a *Candida krusei* utilize um inóculo equivalente à escala 0,5 de McFarland, diluído na proporção de 1:10 e para a *Cryptococcus* spp. utilize um inóculo equivalente à escala 1,0 de McFarland, não diluído.

II.2. Inoculação

- a) As placas são secas durante 20 a 25 minutos a 35 °C antes da inoculação.
- b) Deita-se 0,5 mL (placa de 9 cm) ou 1,0 mL (placa de 14 cm) do inóculo preparado sobre a superfície do ágar (inundação), sendo o excesso de líquido imediatamente removido com uma pipeta.
- c) A placa aberta é seca a 35 °C durante 10 minutos e os comprimidos são colocados na superfície do ágar.

II.3. Incubação e leitura das placas

A incubação a 35 °C de um dia para o outro é adequada para a maioria das estirpes isoladas de infeções sistémicas. O exame e a leitura da placa devem ter lugar ao fim de 18 a 24 horas. Se o crescimento ainda não for visível com determinadas estirpes, as placas podem ser reincubadas durante mais 24 horas, no máximo. Para a *Cryptococcus* spp. incubar a 30 °C durante 42 a 48 horas.

II.4. Medição das zonas de inibição

Para os polienos (anfotericina B e nistatina), mede-se a zona transparente sem crescimento visível no interior. Para estes antifúngicos, as colónias no interior da zona devem ser consideradas como mutantes resistentes. Para os azóis, os imidazóis e a terbinafina, as zonas devem ser medidas até às colónias de dimensões normais. Há frequentemente uma zona de crescimento de colónias parcialmente inibidas cujas dimensões são menores mais próximo do comprimido do que na borda da zona real. Estas colónias de pequena e média dimensão não são mutantes resistentes. Os Neo-Sensitabs contendo imidazóis/azóis contêm doxiciclina a fim de melhorar a qualidade da leitura das suas zonas. Para a fluorocitosina, meça a zona até às colónias de dimensões normais. As colónias individuais no interior da zona são normalmente mutantes *resistentes* (isolar e testar novamente).

CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO

O método de controlo de qualidade utilizando estirpes de ATCC deve ser aplicado pelo menos uma vez por semana e sempre que for introduzido um novo lote de ágar. O diâmetro medido deve encontrar-se dentro dos

limites do diâmetro da zona de controlo da combinação específica de Neo-Sensitabs e estirpes de controlo. Os limites das estirpes de controlo são indicados nas tabelas e indicam o desempenho correcto de todo o método.^{1,3}

RESULTADOS

Compare o diâmetro da zona registado com os indicados nas tabelas. Os resultados obtidos com um organismo específico podem ser relatados como Sensível (S), Intermédio (I) ou Resistente (R)³:

Sensível (S): É de esperar que a infecção devida à estirpe testada responda a uma dosagem normal do agente antimicrobiano presente no comprimido.

Se forem especificados apenas critérios "S": para certas combinações de organismos/antimicrobianas, a ausência de estirpes resistentes impede a definição de qualquer categoria que não seja sensível. Para as estirpes que produzem resultados que sugerem "não sensível", os resultados dos testes de identificação do organismo e de sensibilidade antimicrobiana devem ser confirmados. Subsequentemente, os isolados devem ser enviados a um laboratório de referência para se realizarem outros testes.

Intermédio (I): A categoria intermédia implica a aplicabilidade clínica em locais do organismo onde os fármacos se concentram (por exemplo, na urina) ou quando é possível utilizar uma dosagem elevada de um antimicrobiano (por exemplo, beta-lactâmicos). A categoria intermédia também inclui uma "zona tampão", que deve impedir que pequenos factores técnicos não controlados causem grandes discrepâncias nas interpretações; assim, quando a zona está abrangida pelos limites intermédios, os resultados podem ser considerados equívocos e, se não estiverem disponíveis fármacos alternativos, poderá ser indicado realizar testes das MIC.

Resistente (R): Neste caso, o antimicrobiano não pode ser recomendado para o tratamento.

Testes de rastreio e confirmação para beta-lactamases de espectro alargado (ESBL)

As beta-lactamases transferíveis mediadas por plasmídios que produzem resistência relativamente às cefalosporinas de terceira geração e aos monobactams (por exemplo, aztreonam) foram descritas em estirpes de *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* e outras enterobacteriáceas. Estas enzimas são classificadas como beta-lactamases de espectro alargado (ESBL) e foram implicadas na resistência clínica aos monobactams e às cefalosporinas de largo espectro. Algumas destas estirpes revelarão zonas de inibição inferiores às estirpes sensíveis normais mas superiores aos limites normalizados de certas cefalosporinas de largo espectro ou do aztreonam. Estas estirpes podem ser despistadas utilizando os limites de rastreio das ESBL apropriados. A maioria das ESBL são inibidas por ácido clavulânico, tazobactam ou sulbactam e podem ser rapidamente detectadas pelo teste de sinergia de disco duplo (comprimido).⁶ A ceftazidima + clavulanato e a cefepima + clavulanato são muito úteis para os testes de confirmação das ESBL. Para mais informações, consultar o Guia do Utilizador dos Neo-Sensitabs (www.rosco.dk).¹ Todas as estirpes de ESBL devem ser relatadas como sendo resistentes a todas as penicilinas, cefalosporinas e ao aztreonam.

Estafilococos resistentes à meticilina

O rastreio dos MRSA e da resistência à meticilina (oxacilina) em estafilococos coagulase-negativa deve ser efectuado utilizando Oxacilina 1 µg e Cefoxitina. A resistência indica que todos os beta-lactâmicos devem ser relatados como resistentes. Para mais informações, consultar o Guia do Utilizador dos Neo-Sensitabs (www.rosco.dk).¹

Staphylococcus aureus com sensibilidade reduzida à vancomicina (hVISA, VISA(GISA) e VRSA)

O *Staphylococcus aureus resistente à vancomicina* (VRSA) deve ser detectado utilizando 5 µg de vancomicina, mas a capacidade de detecção de VRSA é desconhecida (ou seja, não avaliada, pois existem poucos isolados clínicos de VRSA detectados em todo o mundo). As estirpes com susceptibilidade reduzida à vancomicina (hVISA e VISA(GISA)) não podem ser detectadas com o actual método de difusão. Mais informações podem ser obtidas no manual do utilizador das Neo-Sensitabs (Neo-Sensitabs User's Guide (www.rosco.dk)).¹

Enterococos resistentes à vancomicina (VRE)

A detecção de VRE pelo método de difusão requer o seguinte:

- 1) Utilização de Neo-Sensitabs com Vancomicina 5 µg,
- 2) Incubação durante 24 horas completas,
- 3) Exame cuidadoso da zona de inibição.

As estirpes sensíveis revelam uma zona com borda acentuada, ao passo que as estirpes resistentes revelam uma borda esbatida. Para mais informações, consultar o Guia do Utilizador dos Neo-Sensitabs (www.rosco.dk).¹

Resistência de alto nível aos aminoglicosídeos (HLR)

A resistência de alto nível aos aminoglicosídeos é uma indicação de que um isolado de enterococos não será afectado sinergisticamente por uma combinação de uma penicilina ou glicopeptídeo mais um aminoglicosídeo. O rastreio da resistência de alto nível à gentamicina e à estreptomina deve ser efectuado em isolados de enterococos provenientes de sangue ou de líquido cefalorraquidiano (LCR). Os Neo-Sensitabs de alto teor como a Gentamicina 250 µg, Canamicina 500 µg e Estreptomina 500 µg são utilizados para despistar este tipo de resistência.

LIMITAÇÕES DOS MÉTODOS DE DIFUSÃO

O objectivo da utilização de Neo-Sensitabs é proporcionar a realização de testes rápidos e rigorosos de sensibilidade antimicrobiana. Os resultados aceitáveis obtidos de estirpes de controlo de qualidade não garantem resultados rigorosos com todos os isolados de doentes. Quando se detectam resultados atípicos ou inconsistentes, devem repetir-se os testes e/ou repetir o processo de identificação para garantir resultados rigorosos. É de considerar se os resultados imprevistos devem ser relatados, podendo os isolados ser enviados para laboratórios de referência para a realização de outros testes.

Podem ocorrer **resultados que induzem perigosamente em erro** quando certos antimicrobianos são testados relativamente a microrganismos específicos.^{3,6} Em certas espécies, os mecanismos resistentes são mais difíceis de detectar do que noutras, podendo alguns resultados aparecer activos in vitro, mesmo que os agentes antimicrobianos não sejam clinicamente eficazes. Estas combinações incluem o seguinte:

- Todos os antibióticos beta-lactâmicos (excepto a oxacilina e a metilina) contra os estafilococos resistentes à metilina
- Cefalosporinas, aminoglicosídeos (excepto nos testes da resistência de alto nível), clindamicina e trimetoprim + sulfametoxazol contra enterococos
- Cefalosporinas de primeira e segunda geração e aminoglicosídeos contra a *Salmonella* spp. e a *Shigella* spp.
- Cefalosporinas contra a *Listeria* spp.
- Os glicopéptidos contra o *S. aureus* com susceptibilidade reduzida à vancomicina
- As cefalosporinas e o aztreonam contra as estirpes de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* produtoras de beta-lactamases de largo espectro.

Os relatórios de rotina de resultados provenientes de estirpes isoladas do LCF podem induzir perigosamente em erro para o tratamento dos doentes nos seguintes casos:

- Agentes administrados apenas por via oral
- Cefalosporinas de primeira e segunda geração (excepto cefuroxima sódica)
- Clindamicina
- Macrolídeos
- Tetraciclina
- Fluoroquinolonas

Certos antimicrobianos estão associados ao aparecimento de resistência durante a terapêutica prolongada. Como consequência, os isolados inicialmente sensíveis podem tornar-se resistentes ao fim de alguns dias após o início do tratamento. Tal ocorre com mais frequência nos seguintes casos:

- *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Serratia* spp. com cefalosporinas de terceira geração
- *Pseudomonas aeruginosa* com a maioria dos antimicrobianos
- Estafilococos com quinolonas

Essencialmente todos os isolados de *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Providencia* spp., *Proteus* spp. (excepto *P. mirabilis*), *Serratia marcescens* e *P. aeruginosa* possuem os genes para a produção de

beta-lactamase do grupo I. Por conseguinte, não há informações úteis resultantes da demonstração da indução in vitro da enzima. Os laboratórios devem concentrar-se na repetição dos testes (cada 3-4 dias) de isolados recuperados repetidamente de doentes infectados durante a terapêutica para detectar a selecção de clones que produzem, de forma constitutiva, beta-lactamase do grupo I.

REFERÊNCIAS:

- 1) Neo-Sensitabs User's Guide. 2013. www.rosco.dk.
- 2) National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2004. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved Standard M11-A6. 6th ed. NCCLS, Wayne, Pa., USA.
- 3) National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2009. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standard M2-S10. NCCLS, Wayne, Pa., USA.
- 4) National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for bacteria isolated from animals. Approved Standard M31-A2. 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa., USA.
- 5) Ericsson H.M. and J.C. Sherris. 1971. Antibiotic susceptibility testing. Report of an international collaborative study. Acta Path. Microbiol. Scand. Sec. B, Suppl. 217: 1-90.
- 6) Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. 2013. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100-S23. 23rd Informational Suppl. CLSI, Wayne, Pa., USA.