

Discos de Antibiograma OXOID

A linha de discos para antibiograma da OXOID conta com cerca de 200 itens com diferentes antibióticos e concentrações.

- Seleção dos melhores reagentes, soluções e antibióticos na fabricação dos discos
- Padrão OXOID de qualidade
- Limite de aceitação de 90-125% (recomendação FDA: 67-150%, WHO: 75-135%)
- Certificado de qualidade para cada lote de disco produzido
- Embalagem desenvolvida para controle da umidade e estabilidade dos antibióticos no disco
- Disponibilidade de dispensadores de 6, 8 e 12 discos, bem como ejetores para aplicação individual dos discos nas placas
- Código e concentração do antibiótico escrito dos dois lados do disco, evitando erros de leitura
- Adequação às normas internacionais

Teste de suscetibilidade a antibióticos: Guia para a melhor prática (link: [ArtigoCientificoAST.pdf](#))

Teste de Suscetibilidade a Antibióticos

Guia para a Melhor Prática

Applenton, A.¹

Resumo

Embora o teste de disco-difusão seja fácil de realizar, há áreas-chave que precisam ser controladas:

- Condições de armazenamento do disco;
- Preparo do meio;
- Nível de inóculo;
- Condições de incubação.

Resultados precisos e reprodutíveis se baseiam em

materiais de qualidade e atenção a detalhes. O corpo clínico precisa confiar nos resultados dos testes provenientes do laboratório, que só podem ser conseguidos ao se adotar procedimentos adequados.

Palavras-Chave: Teste de Suscetibilidade.

Summary

Although the disc diffusion test simple to perform, there are key areas which need to be controlled:

- Disc storage conditions
- Media manufacture
- Inoculum level
- Incubation conditions.

Accurate and reproducible results rely on quality materials and attention to detail.

Clinicians must have confidence in laboratory test results; these can only be achieved by adhering to proper procedures.

Key Words: Sensitivity Testing.

O método de disco-difusão é um dos testes de sensibilidade a antibióticos mais simples e utilizados nos laboratórios clínicos. O teste de disco-difusão é uma técnica extremamente flexível com uma grande variedade de antibióticos e concentrações disponíveis, que podem ser facilmente intercambiadas se necessário. Este guia foi concebido para ilustrar potenciais fontes de erro que podem surgir no teste e como minimizá-las ao máximo.

O teste de disco-difusão não somente categoriza microrganismos resistentes, intermediários e suscetíveis por meio dos resultados quantitativos, como também fornece uma indicação visual de:

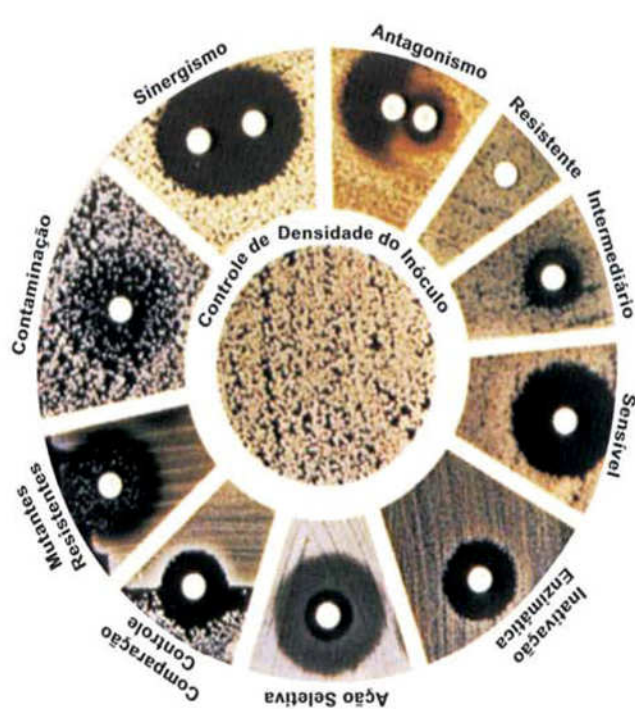
- nível do inóculo;
- presença de contaminação;
- antagonismo e sinergismo entre antibióticos adjacentes;
- atividade β -lactamase.



Dispensador de discos

¹Gerente de Produtos Oxoid Limited / UK;

Tradução-Revisão: Dra. Ana Maria de Paula (CRB 10.527/01-D) - Diretora Geral Oxoid Brasil Ltda.



Indicação Visual (controle/resultados)

Se o Ágar Müeller-Hinton for o meio de escolha, ele deve ser preparado para que seja compatível com a CLSI M6-A2, que controla rigorosamente muito dos fatores de variação do meio de cultura, como concentração de cátions, pH, nível de inibidores de antibióticos. Se esses fatores não estiverem sob controle, os resultados obtidos podem ser altamente afetados. Embora não haja nenhum padrão internacional atual para Ágar Iso-Sensitest ou Ágar Diagnostic Sensitivity Test, os usuários devem se assegurar de que seus fornecedores se submetem a rigorosos sistemas de qualidade para a fabricação de um produto confiável, por exemplo, ISO 9001 e ISO 9002.

Uma vez que os produtos para testes de suscetibilidade a antibióticos estejam no laboratório, eles devem ser armazenados conforme as instruções do fabricante, pois a variação de temperatura e umidade poderão causar degradação dos mesmos. Os protocolos de preparação de meios de cultura

devem ser rigorosamente obedecidos, pois um número de fatores neste processo pode influenciar no tamanho das zonas de inibição obtidas.

Profundidade de ágar

Nos testes de sensibilidade, a profundidade do ágar recomendada é de 4 mm no centro da placa de Petri (aproximadamente 25 ml para uma placa de 90 mm).

Variação na profundidade afetará os tamanhos das zonas de inibição - se o ágar estiver muito reduzido, zonas maiores irão aparecer, uma vez que o volume abaixou e a concentração de antibiótico aumentou. Se o ágar estiver muito profundo, zonas menores irão aparecer, devido à diminuição da concentração de antibiótico. Se o ágar for intencionalmente reduzido, então pequenas modificações em relação a outros fatores terão efeito desproporcional.

pH

O pH do meio após o preparo

Embora o teste de disco-difusão seja simples de se realizar, para obter resultados exatos e reprodutíveis, é necessário atenção e cuidado a detalhes, uma vez que mudanças relativamente pequenas nos procedimentos de operação podem afetar os resultados obtidos.

A consideração inicial deve ser o investimento em produtos de qualidade, utilizados para a realização do teste de suscetibilidade antimicrobiana. Há três principais padrões internacionais sobre a potência de antibióticos nos discos, sendo que nem todos os fabricantes produzem de acordo com os mesmos padrões:

ESPECIFICAÇÃO FDA	67-150% da concentração determinada
ESPECIFICAÇÃO WHO	75-135% da concentração determinada
ESPECIFICAÇÃO DIN	90-125% da concentração determinada.

A OXOID produz os discos de acordo com a especificação DIN, o padrão internacional mais rigoroso.

precisa estar dentro do nível de variação estabelecida pelo fabricante - ele é, normalmente, próximo a neutro. Se o pH estiver fora dos parâmetros estabelecidos, os tamanhos das zonas serão alterados, com o grau de alteração determinado pelo grupo de antibióticos. Por exemplo, um aumento no pH causará diminuição nas zonas de penicilinas e quinolonas; inversamente, o aumento de pH irá incorrer em um aumento das zonas de inibição em relação aos macrolídeos e aminoglicosídeos. O pH deve ser parte da rotina dos testes de controle de qualidade para cada lote de meio preparado. Meios que estão fora das especificações do fabricante em relação ao pH não devem ser usados em testes de sensibilidade.

Armazenamento do meio de cultura

Uma vez preparadas, as placas contendo meios de cultura devem ser armazenadas apropriadamente a fim de não serem contaminadas

ou ficarem muito secas (por exemplo, se os meios ficarem armazenados por muito tempo ou próximos a sistemas de ventilação).

A umidade no meio tem um papel importante na difusão do disco: quando os discos de antibiótico são aplicados sobre ágar, a umidade da placa é absorvida, dissolvendo o antibiótico e permitindo sua difusão no ágar. Desta forma, um nível reduzido de umidade impedirá o fluxo do antibiótico e resultará em zonas menores.

Fornecedores de meios prontos devem estabelecer uma data de validade em seus produtos. As placas não devem ser usadas depois desta data. Os laboratórios que preparam seus próprios meios devem validar suas condições de armazenamento.

Nível do inóculo

O nível do inóculo é um dos fatores mais importantes e variáveis nos testes de suscetibilidade e tem um significativo efeito no tamanho da zona de inibição obtida. O limite da zona é determinado quando a massa crítica é atingida. Se o inóculo estiver pesado, a massa crítica será atingida em menos tempo e a zona será menor. Se o inóculo estiver leve, a massa crítica levará mais tempo para se desenvolver, o antibiótico se difunde mais longe e uma zona maior é obtida. O nível de inóculo recomendado para ser usado em testes de sensibilidade varia entre os métodos padrão e pode ter uma diferença de até 100 diluições, dependendo do critério. Vale ressaltar que cada inóculo trabalhará perfeitamente bem com o método padrão e limites máximos (*breakpoints*)

Figura 1	Critério de Tamanho de Zona (mm)	
	CLSI	DIN
Antibiótico	0.5 McFarland	1:100 diluição de 0.5 McFarland
Penicilina G 10 IU	26 - 37	35 - 45



dados para aquele método.

O impacto do nível de inóculo no tamanho da zona é ressaltado ao se comparar os parâmetros de controle de qualidade para os vários métodos padrão, como mostra a **Figura 1**, onde a única variável é o nível de inóculo. Ambos métodos (CLSI e DIN) usam o Ágar Mueller-Hinton com *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

É, portanto, fundamental se adotar um nível de inóculo mais próximo possível ao recomendado, uma vez que o critério de interpretação do tamanho da zona de inibição é específico para um nível de inóculo e meio de cultura em particular. Turbidímetros e referências de controle de densidade estão disponíveis para

ajudar nesta área, pois pequenas variações aqui podem alterar significativamente o resultado final.

Após a inoculação da placa, os discos devem ser aplicados o mais rápido possível. Atrasos neste ponto do teste darão ao microrganismo chance de começar a replicar antes do antibiótico ser aplicado, resultando potencialmente em tamanhos menores de zonas.

Armazenamento dos discos

Os discos de antibióticos devem ser armazenados de acordo com as instruções do fabricante, por exemplo, entre -20°C e +8°C em recipiente com lacre e dessecante. Cartuchos que não estão sendo usados

zonas. Placas incubadas em grandes pilhas terão uma má transferência de calor para o centro da mesma e, desta maneira, os antibióticos se difundirão antes que o teste chegue à temperatura, resultando potencialmente em tamanhos maiores de zonas. Foi demonstrado que uma placa em prateleira de metal leva uma hora para aquecer até 1°C da temperatura da incubadora. Entretanto, cinco placas empilhadas levam até quatro horas para que a placa do centro alcance a mesma temperatura.

Condições atmosféricas de incubação

As condições atmosféricas sob as quais um microrganismo é incubado também afetam o tamanho das zonas de inibição. Por exemplo, um *Streptococcus pneumoniae* ou um *Haemophilus influenzae* incubados em aerobiose não irão se desenvolver, e dessa forma parecerão mais sensíveis frente aos antibióticos. Entretanto, incubando estes microrganismos em CO₂ causará uma queda no pH, o que

afetará o tamanho das zonas em diferentes graus (como já discutido). Para estes microrganismos fastidiosos, os fatores de pH e taxa de crescimento devem ser levados em conta quando os limites máximos (*breakpoints*) tiverem sido estabelecidos.

Temperatura de incubação

As temperaturas de incubação para os métodos padrão são estabelecidas entre 35-37°C, que são consideradas ideais para a maioria dos patógenos humanos. Se a temperatura for mais baixa, a taxa de crescimento diminuirá, resultando em aumento de tempo para atingir a massa crítica ou confluência. Um aumento de tempo para atingir a massa crítica aumentará a difusão dos antibióticos e o tamanho de zona. Uma maior temperatura de incubação também resultará em zonas menores, uma vez que os microrganismos podem ficar comprometidos em temperaturas elevadas e os antibióticos se difundirão mais facilmente devido a possíveis alterações da viscosidade do ágar.

Se os resultados estiverem fora dos parâmetros esperados, isso indica problemas potenciais com as amostras do dia, uma vez que todos os testes devem ser expostos às mesmas condições. Razões para esta falha podem ser rapidamente pesquisadas e solucionadas.

Microrganismos usados como padrão de controle estão comercialmente disponíveis para proporcionar aos laboratórios o uso de culturas frescas para o controle de qualidade. Repetidas subculturas nos procedimentos de controle podem resultar em contaminação e perda do procedimento de controle.

Métodos padrão

Existem vários métodos padrão disponíveis em diferentes regiões geográficas. Os usuários devem verificar regularmente as atualizações dos métodos, uma vez que a metodologia e o limite máximo (*breakpoints*) venham a mudar. A introdução de novos antibióticos pode ter um impacto significativo na interpretação dos resultados obtidos.

Controle de qualidade

A checagem do controle de qualidade deve, de maneira ideal, ser efetuada diariamente, a fim de monitorar todos os aspectos do teste de suscetibilidade: meio (profundidade, pH, etc.), nível de inóculo, integridade do disco de antibiótico, temperatura e condições atmosféricas de incubação. O teste de controle de qualidade é realizado com cêpas de referência (por exemplo, ATCC, NCTC), onde se esperam resultados conhecidos.

Fontes de Referências úteis

Antibiotics in Laboratory Medicine Lorian.
Antibiotic and Chemotherapy O'Grady,
Lambert, Finch and Greenwood.



Turbidímetro



Figura 2



Figura 3

Problemas devido à má utilização de Dispensadores de Discos

devem ser armazenados fechados, em suas embalagens originais, a fim de prevenir o ingresso de umidade. Isto é extremamente importante, pois se sabe que a umidade é a maior causa da degradação dos antibióticos.

Cartuchos abertos devem ser lacrados e resfriados no próprio dispensador de discos ou em outro recipiente específico, quando não estiverem sendo usados.

O dessecante na base dos dispensadores de disco deve ser reativado regularmente, a fim de ajudar a manter o ambiente livre de umidade. Depois da reativação, deve-se verificar cuidadosamente o dessecante para assegurar de que o corante indicador voltou à sua cor original. Se o dessecante não retornou a uma cor forte, próxima a cor inicial, deve ser substituído. Após o armazenamento sob refrigeração, os dispensadores precisam atingir a temperatura ambiente antes de remover a tampa, a fim de prevenir condensação e ingresso de umidade.

Cartuchos abertos não devem ser armazenados por mais de uma semana. Cartuchos que contêm inibidores de β -lactamase (por exemplo, ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam) são particularmente suscetíveis à degradação devido à umidade.

Se os cartuchos forem mantidos abertos por mais de uma semana, teste de controle de qualidade deve ser efetuado diariamente para validar a estabilidade dos antibióticos.

Cartuchos de antibiótico e suas embalagens externas têm uma data de validade registrada. Os discos não devem ser usados após esta data.

Ajustes nos dispensadores de disco

Antes dos antibióticos serem colocados no dispensador, a altura da base do dispensador deve ser ajustada a fim de se igualar à profundidade do ágar. Se o dispensador for ajustado erroneamente, os discos serão pressionados em demasia, podendo ser

enterrados no ágar. Como consequência, o mecanismo que pressiona os discos na superfície do ágar pode se contaminar, podendo, dessa forma, contaminar sucessivas placas. Se o dispensador for contaminado, o mecanismo pode ser limpo usando um algodão embebido em álcool. Este procedimento deve ser realizado semanalmente como medida preventiva, ao menos que uma grande contaminação aconteça e uma limpeza imediata se faça necessária.

Se o dispensador for ajustado muito alto, os discos podem não ser pressionados na superfície do ágar. Isto pode levar a um espaçamento irregular dos discos e conseqüentemente a zonas sobrepostas ou ilegíveis (veja a **Figura 2**, onde um disco foi colocado na borda da placa). Se o contato entre os discos e o ágar for insuficiente, a umidade pode não ingressar no disco e o antibiótico não irá se difundir. Isto é especialmente problemático com antibióticos de grande peso molecular como vancomicina e teicoplanina, que em geral têm dificuldades em se difundir pelo ágar, (**Figura 3** - todos os discos deveriam ter produzido uma zona de inibição).

Se o dispensador for ajustado muito alto, os discos podem não ser pressionados na superfície do ágar. Isto pode levar a um espaçamento irregular dos discos e conseqüentemente a zonas sobrepostas ou ilegíveis (veja a **Figura 2**, onde um disco foi colocado na borda da placa). Se o contato entre os discos e o ágar for insuficiente, a umidade pode não ingressar no disco e o antibiótico não irá se difundir. Isto é especialmente problemático com antibióticos de grande peso molecular como vancomicina e teicoplanina, que em geral têm dificuldades em se difundir pelo ágar, (**Figura 3** - todos os discos deveriam ter produzido uma zona de inibição).

Incubação

Uma vez que os discos foram aplicados ao ágar, as placas precisam ser incubadas o mais rápido possível. Atrasos antes da incubação farão com que o antibiótico se difunda antes que o microrganismo comece a crescer e resultará em tamanhos maiores de