

# Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada – Oitava Edição

---

O presente documento contém os métodos atualmente recomendados pelo NCCLS para testes de sensibilidade por disco-difusão, critérios para testes de controle de qualidade e tabelas atualizadas para interpretação dos halos de inibição.

Norma de aplicação global desenvolvida através do processo consensual do NCCLS.





Permission to translate the M2-A8 has been granted to ANVISA by CLSI (Formerly NCCLS). In the event of any variations in meaning that may be introduced through translation, the original NCCLS publication (in English) is authoritative. For each standard, the interpretive data are valid only if the methodology in the standard is followed. NCCLS frequently updates the interpretive tables through new editions and supplements. Users should refer to the most recent edition.

In January 2005, NCCLS changed its name to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Copies of the complete current standards and informational supplement (in English) may be obtained from CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898, U.S.A.; telephone: +610.688.0100; fax: +610.688.-700; Internet: [www.clsi.org](http://www.clsi.org).

The permission granted by NCCLS/CLSI is limited to distribution of M2-A8 by ANVISA to clinical laboratories in Brazil. Permission to reproduce additional copies or otherwise use the text of these documents to an extent not permitted under Copyright Law must be obtained in writing from the Clinical and Laboratory Standards Institute.

#### **Coordenação da Tradução**

**Silvia Figueiredo Costa**

**Doutora em Doenças Infecciosas e Parasitárias pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Organização Pan Americana de Saúde**

#### **Revisores:**

**Ana Gales**

**Professora adjunta da Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina, professora adjunta do curso de Medicina da Universidade São Francisco, Bragança Paulista, Diretora do laboratório Alerta, da Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina.**

**Antonia Maria de Oliveira Machado**

**Doutora em Medicina pela Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina, Diretora Técnica do Laboratório Central do Hospital São Paulo-UNIFESP**

#### **Direitos de Tradução e Reprodução**

**Agência Nacional de Vigilância Sanitária**

**Gerencia Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde**

# NCCLS...

## Servindo A Comunidade Mundial das Ciências Médicas Através de Consenso Voluntário

O NCCLS é uma organização internacional interdisciplinar, sem fins lucrativos, de desenvolvimento de normas/padrões e educação, que promovem o desenvolvimento e uso de normas/padrões e diretrizes consensuais voluntárias na comunidade de atenção à saúde. É reconhecido no mundo inteiro pela aplicação de seu singular processo consensual ao desenvolvimento de normas/padrões e diretrizes para testes de patologia clínica e questões relacionadas à atenção de saúde. O NCCLS baseia-se no princípio de que o consenso é uma maneira efetiva e custo-eficaz de melhorar os testes clínicos e serviços de atenção à saúde.

Além de desenvolver e promover o uso voluntário de normas/padrões e diretrizes consensuais, o NCCLS constitui um foro aberto e isento para tratar questões que afetam a qualidade dos testes de patologia clínica e a atenção à saúde.

### PUBLICAÇÕES

Os documentos do NCCLS são publicados como normas/padrões, diretrizes ou relatórios de comitê.

**Norma** – Documento desenvolvido através do processo de consenso, o qual identifica claramente os requisitos específicos e essenciais dos materiais, dos métodos, ou das práticas a serem usados sem modificações. Uma norma também pode conter elementos discricionários, que são claramente identificados.

**Diretriz** – Documento desenvolvido através do processo de consenso, o qual descreve os critérios para as práticas, os procedimentos, ou os materiais operacionais gerais a serem usados de maneira voluntária. Uma diretriz pode ser usada conforme redigida, ou modificada pelo usuário para Adequá-las às suas necessidades específicas.

**Relatório** – Documento que não passou pela revisão consensual e foi publicado pela Diretoria.

### PROCESSO CONSENSUAL

O processo consensual voluntário do NCCLS é um protocolo que estabelece critérios formais para:

- autorizar um projeto;
- desenvolver e revisar documentos de maneira transparente;
- revisar documentos em resposta a comentários de usuários;
- aceitar um documento como norma/padrão ou diretriz consensual.

A maioria dos documentos do NCCLS é sujeita a dois níveis de consenso—“proposto” e “aprovado”. Dependendo da necessidade de avaliação ou coleta de dados, os documentos também podem ser disponibilizados para revisão em nível consensual intermediário (i.e., “tentativo”).

**Proposta** – Documento consensual do NCCLS que passa por um primeiro estágio de revisão pela comunidade de saúde como proposta de norma/padrão ou diretriz. O documento deve receber uma revisão técnica abrangente e minuciosa, incluindo a revisão geral de seu escopo, enfoque

e utilidade, e uma revisão detalhada de seu conteúdo técnico e editorial.

**Tentativa** - Uma norma/padrão ou diretriz tentativa é disponibilizada para revisão e comentários apenas quando há necessidade evidente de avaliação de campo de um método recomendado ou de coleta de dados específicos relativos a protocolo recomendado. Deve ser revisada para assegurar sua utilidade.

**Aprovada** – Norma/padrão ou diretriz que recebeu aprovação consensual da comunidade de atenção à saúde. Deve ser revisada para se avaliar a utilidade do documento final, garantir que se chegue a um consenso (ex., que os comentários relativos a versões anteriores foram satisfatoriamente resolvidos) e identificar qualquer necessidade de documentos consensuais adicionais. As normas/padrões e diretrizes do NCCLS representam uma opinião consensual sobre as boas práticas e refletem um acordo substancial das partes interessadas, competentes e afetadas materialmente, obtido por meio dos procedimentos consensuais estabelecidos pelo NCCLS. As exigências das normas/padrões e diretrizes do NCCLS podem ser mais ou menos rigorosas do que as regulamentações pertinentes. Conseqüentemente, o acatamento desse documento consensual voluntário não dispensa o usuário da responsabilidade de obedecer às regulamentações pertinentes.

### COMENTÁRIOS

Os comentários dos usuários são essenciais ao processo consensual. Qualquer pessoa pode apresentar um comentário, e todos os comentários são considerados pelo comitê do NCCLS que preparou o documento, em conformidade com o processo consensual. Todos os comentários, incluindo aqueles que resultam em mudança no documento quando publicado no próximo nível consensual, bem como aqueles que não resultam em mudança, são respondidos pelo comitê num apêndice do documento. Incentiva-se os leitores a tecer comentários de qualquer formato e em qualquer oportunidade sobre qualquer documento do NCCLS. Envie seus comentários ao seguinte endereço: NCCLS Executive Offices, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087, Estados Unidos.

### PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

Os profissionais de saúde de todas as especialidades são motivados a participar voluntariamente nos projetos do NCCLS. Para informações adicionais sobre participação nos comitês, favor contatar os Escritórios Executivos do NCCLS.

# Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão; Norma Aprovada—Oitava Edição

## Resumo

Os testes de sensibilidade são indicados para qualquer organismo responsável por um processo infeccioso que exija terapia antimicrobiana, quando é impossível prever a sensibilidade desse organismo, mesmo conhecendo a sua identificação. Os testes de sensibilidade são indicados, com maior frequência, quando se acredita que o organismo causador pertence a uma espécie capaz de apresentar resistência aos agentes antimicrobianos normalmente usados.

Diversos métodos laboratoriais podem ser utilizados para medir a sensibilidade *in vitro* das bactérias aos agentes antimicrobianos. Em muitos laboratórios de microbiologia clínica, utiliza-se rotineiramente o método de disco-difusão em ágar para testar os patógenos mais comuns, de crescimento rápido e determinadas bactérias fastidiosas. O presente documento inclui uma série de procedimentos para padronizar a execução dos testes de disco-difusão. Descrevem-se também o desempenho, as aplicações e as limitações dos métodos atualmente recomendados pelo NCCLS.

As informações suplementares (tabelas M100) apresentadas com as presentes normas constituem as informações mais atualizadas para seleção de drogas, interpretação e controle de qualidade usando os procedimentos padronizados no documento M2. Essas tabelas foram atualizadas e deverão substituir as tabelas publicadas em anos anteriores. As mudanças nas tabelas posteriores à edição anterior (M100-S12) estão em **negrito**. Além disso, acrescentou-se, às tabelas, um glossário de termos, classes e abreviações de antibióticos (para uso com os discos de testes de sensibilidade antimicrobiana e outros dispositivos de teste *in vitro*). Acredita-se que esse glossário constituirá um recurso com informações adicionais para os usuários da norma M2, uma vez que apresenta a terminologia empregada nos documentos dos testes de sensibilidade, que podem ser pouco familiares ou confusos para os usuários dos laboratórios. O glossário, como parte das informações tabulares da norma M100, será sempre atualizado em futuras revisões (anuais) da norma M100.

NCCLS. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition*. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

O processo consensual do NCCLS, mecanismo que permite a revisão de um documento, em dois ou mais níveis, pela comunidade de atenção à saúde, é um processo permanente. Os usuários devem prever edições revisadas de qualquer documento. Uma vez que as rápidas mudanças nas tecnologias possam afetar os procedimentos, métodos e protocolos nas normas/padrões e diretrizes, os usuários devem substituir as edições ultrapassadas pelas edições atualizadas dos documentos do NCCLS. As edições atualizadas estão relacionadas no *NCCLS Catalog*, distribuído às organizações membros e, mediante solicitação, aos não-membros. Se sua organização não é membro do NCCLS e gostaria de ser, assim como para solicitar um exemplar do *NCCLS Catalog*, favor contatar os Escritórios Executivos do NCCLS Executive Offices. Telefone: 610.688.0100; Fax: + 1 610.688.0700; E-Mail: [exoffice@nccls.org](mailto:exoffice@nccls.org); Website: [www.nccls.org](http://www.nccls.org)

## Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão; Norma Aprovada—Oitava Edição

### Volume 23 Número 1

Mary Jane Ferraro, Ph.D., M.P.H., Presidente  
Matthew A. Wikler, M.D., M.B.A., Vice Presidente  
William A. Craig, M.D.  
Michael N. Dudley, Pharm.D.  
George M. Eliopoulos, M.D.  
David W. Hecht, M.D.  
Janet Hindler, MCLS, M.T. (ASCP)  
L. Barth Reller, M.D.  
Albert T. Sheldon, Jr., Ph.D.  
Jana M. Swenson, M.M.Sc.  
Fred C. Tenover, Ph.D.  
Raymond T. Testa, Ph.D.  
Melvin P. Weinstein, M.D.



Esta publicação é protegida pelas leis de direitos autorais. Nenhuma parte pode ser reproduzida, armazenada em sistema de recuperação, transmitida, ou disponibilizada em qualquer formato ou por qualquer meio (eletrônico, mecânico, fotocópia, gravação, ou outros) sem consentimento prévio, por escrito, do NCCLS, exceto nos casos relacionados a seguir.

Pelo presente instrumento, o NCCLS concede autorização para reproduzir partes limitadas desta publicação, para uso em manuais de procedimentos laboratoriais, num único local; para empréstimo entre bibliotecas; ou para uso em programas educacionais, sempre que as várias cópias dessa reprodução forem distribuídas gratuitamente, não contenham, em qualquer circunstância, mais do que 20% do texto do documento e incluam o seguinte aviso:

Reproduzido mediante autorização e parte da publicação do NCCLS ‘M2-A8—*Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition* (ISBN 1-56238-485-6). Cópias da atual edição podem ser obtidas no seguinte endereço: NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA.

Autorização para reproduzir ou usar o texto deste documento além das isenções aqui concedidas ou nos termos da Legislação de Direitos Intelectuais pode ser obtida do NCCLS mediante solicitação por escrito. As autorizações podem ser obtidas no seguinte endereço: Executive Director, NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, EEUU.

Copyright ©2003. The National Committee for Clinical Laboratory Standards.

### **Citação Sugerida**

(NCCLS. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition*. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.)

#### **Norma Proposta**

Julho de 1975

#### **Norma Tentativa**

Outubro de 1979

#### **Norma Aprovada**

Dezembro de 1984

#### **Norma Tentativa—Quarta Edição**

Novembro de 1988

#### **Norma Aprovada—Quarta Edição**

Abril de 1990

#### **Norma Aprovada—Quinta Edição**

Dezembro de 1993

#### **Norma Aprovada—Sexta Edição**

Janeiro de 1997

#### **Norma Aprovada—Sétima Edição**

Janeiro de 2000

#### **Norma Aprovada—Oitava Edição**

Janeiro de 2003

ISBN 1-56238-485-6

ISSN 0273-3099

## **Membros do Comitê**

### **Comitê da Área de Microbiologia**

James H. Jorgensen, Ph.D. Presidente	University of Texas Health Science Center San Antonio, Texas
Mary Jane Ferraro, Ph.D., M.P.H. Vice Presidente	Massachusetts General Hospital Boston, Massachusetts

### **Subcomitê para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana**

Mary Jane Ferraro, Ph.D., M.P.H. Presidente	Massachusetts General Hospital Boston, Massachusetts
Matthew A. Wikler, M.D., M.B.A. Vice Presidente	ViroPharma, Incorporated Exton, Pennsylvania
William A. Craig, M.D.	University of Wisconsin Madison, Wisconsin
Michael N. Dudley, Pharm.D.	Essential Therapeutics, Inc. Mountain View, California
George M. Eliopoulos, M.D.	Beth Israel Deaconess Medical Center Boston, Massachusetts
David W. Hecht, M.D.	Loyola University Medical Center Maywood, Illinois
Janet Hindler, MCLS, M.T. (ASCP)	UCLA Medical Center Los Angeles, California
L. Barth Reller, M.D.	Duke University Medical Center Durham, North Carolina
Albert T. Sheldon, Jr., Ph.D.	Food and Drug Administration Rockville, Maryland
Jana M. Swenson, M.M.Sc.	Centers for Disease Control and Prevention Atlanta, Georgia
Fred C. Tenover, Ph.D.	Centers for Disease Control and Prevention Atlanta, Georgia
Raymond T. Testa, Ph.D.	Wyeth-Ayerst Research Pearl River, New York
Melvin P. Weinstein, M.D.	Robert Wood Johnson Medical School New Brunswick, New Jersey

## Consultores

Steven D. Brown, Ph.D.	Clinical Microbiology Institute Wilsonville, Oregon
Karen Bush, Ph.D.	R.W. Johnson Pharmaceutical Research Institute Raritan, New Jersey
Franklin R. Cockerill, III, M.D.	Mayo Clinic/Mayo Foundation Rochester, Minnesota
Mike E. Cox	Anaerobe Systems Morgan Hill, California
Sharon K. Cullen, B.S., RAC	Dade Behring Inc. MicroScan West Sacramento, California
Dwight J. Hardy, Ph.D.	University of Rochester Medical Center Rochester, New York
Ronald N. Jones, M.D.	The JONES Group/JMI North Liberty, Iowa
Donald E. Low, M.D.	Toronto Medical Labs. & Mount Sinai Hospital University of Toronto
John E. McGowan, Jr., M.D.	Emory University, Rollins School of Public Health Atlanta, Georgia
Professor Ian Phillips	EUCAST Malaga, Espanha
James A. Poupard, Ph.D.	GlaxoSmithKline Collegeville, Pennsylvania
Robert P. Rennie, Ph.D.	University of Alberta Hospital Edmonton, Alberta, Canadá
Rosemary Roberts, M.D.	FDA Division of Anti-Infective Drug Products Rockville, Maryland
Daniel F. Sahm, Ph.D.	Focus Technologies Inc. Herndon, Virginia
Sally Selepak, M.T. (ASCP)	FDA Center for Devices/Rad. Health Rockville, Maryland
Daniel L. Shungu, Ph.D.	Merck & Company, Inc. Rahway, New Jersey
John D. Turnidge, M.D.	Women's and Children's Hospital North Adelaide, Austrália
Linda J. Utrup, Ph.D.	USDA Riverdale, Maryland
Lois M. Schmidt, D.A. Oficial de Ligaçao	NCCLS Wayne, Pennsylvania

## **Consultores (continuação)**

Tracy A. Dooley, M.L.T. (ASCP)  
Gerente de Projetos

NCCLS  
Wayne, Pennsylvania

Patrice E. Polgar  
Editora

NCCLS  
Wayne, Pennsylvania

Donna M. Wilhelm  
Editora Assistente

NCCLS  
Wayne, Pennsylvania

## **Membros Ativos** (em 1º de outubro de 2002)

### **Membros Provedores**

Abbott Laboratories  
American Association for  
Clinical Chemistry  
Beckman Coulter, Inc.  
BD and Company  
bioMérieux, Inc.  
CLMA  
College of American Pathologists  
GlaxoSmithKline  
Nippon Becton Dickinson Co., Ltd.  
Ortho-Clinical Diagnostics, Inc.  
Pfizer Inc  
Roche Diagnostics, Inc.

### **Membros Institucionais**

AISAR-Associazione Italiana per lo  
Studio degli  
American Academy of Family  
Physicians  
American Association for  
Clinical Chemistry  
American Association for  
Respiratory Care  
American Chemical Society  
American Medical Technologists  
American Public Health Association  
American Society for Clinical  
Laboratory Science  
American Society of Hematology  
American Society for Microbiology  
American Type Culture  
Collection, Inc.  
Asociacion Mexicana de  
Bioquímica Clínica A.C.  
Assn. of Public Health Laboratories  
Assoc. Micro. Clinici Italiani-  
A.M.C.L.I.  
British Society for Antimicrobial  
Chemotherapy  
CADIME-Camara De Instituciones  
De Diagnostico Medico  
Canadian Society for Medical  
Laboratory Science—Société  
Canadienne de Science de  
Laboratoire Médical  
Clinical Laboratory Management  
Association  
COLA  
College of American Pathologists  
College of Medical Laboratory  
Technologists of Ontario  
College of Physicians and  
Surgeons of Saskatchewan  
ESCMID  
Fundación Bioquímica Argentina

International Association of Medical  
Laboratory Technologists  
International Council for  
Standardization in Haematology  
International Federation of  
Clinical Chemistry  
Italian Society of Clinical  
Biochemistry and Clinical  
Molecular Biology  
Japan Society of Clinical Chemistry  
Japanese Committee for Clinical  
Laboratory Standards  
Joint Commission on Accreditation  
of Healthcare Organizations  
National Academy of Clinical  
Biochemistry  
National Association of Testing  
Authorities – Australia  
National Society for  
Histotechnology, Inc. Ontario  
Medical Association  
Quality Management Program-  
Laboratory Service  
RCPA Quality Assurance Programs  
PTY Limited  
Sociedade Brasileira de Analises  
Clinicas  
Sociedad Espanola de Bioquímica  
Clínica y Patología Molecular  
Taiwanese Committee for Clinical  
Laboratory Standards (TCCLS)  
Turkish Society of Microbiology

### **Membros do Governo**

Association of Public Health  
Laboratories  
Armed Forces Institute of Pathology  
BC Centre for Disease Control  
Centers for Disease Control and  
Prevention  
Centers for Medicare & Medicaid  
Services/CLIA Program  
Centers for Medicare & Medicaid  
Services  
Chinese Committee for Clinical  
Laboratory Standards  
Commonwealth of Pennsylvania  
Bureau of Laboratories  
Department of Veterans Affairs  
Deutsches Institut für Normung  
(DIN)  
FDA Center for Devices and  
Radiological Health  
FDA Center for Veterinary  
Medicine  
FDA Division of Anti-Infective

Drug Products  
Iowa State Hygienic Laboratory  
Massachusetts Department of  
Public Health Laboratories  
National Center of Infectious and  
Parasitic Diseases (Bulgaria)  
National Health Laboratory Service  
(South Africa)  
National Institute of Standards  
and Technology  
New York State Department of  
Health  
Ohio Department of Health  
Ontario Ministry of Health  
Pennsylvania Dept. of Health  
Saskatchewan Health-  
Provincial  
Laboratory  
Scientific Institute of Public Health;  
Belgium Ministry of Social  
Affairs, Public Health and the  
Environment  
Swedish Institute for Infectious  
Disease Control  
Thailand Department of Medical  
Sciences

### **Membros da Indústria**

AB Biodisk  
Abbott Laboratories  
Abbott Laboratories, MediSense  
Products  
Acrometrix Corporation  
Alifax S.P.A.  
Ammirati Regulatory Consulting  
Anaerobe Systems  
Assessor  
AstraZeneca  
AstraZeneca R  
&D  
Boston Avant Immunotherapeutics,  
Inc. Aventis  
Axis-Shield POC AS  
Bayer Corporation – Elkhart, IN  
Bayer Corporation – Tarrytown,  
NY Bayer Corporation – West  
Haven, CT  
Bayer Medical Ltd.  
BD  
BD Biosciences – San Jose,  
CA BD Consumer Products  
BD Diagnostic Systems  
BD Italia S.P.A.  
BD VACUTAINER Systems  
Beckman Coulter, Inc.  
Beckman Coulter, Inc. Primary

Care	Therapeutics, Inc. EXPERTech Associates, Inc.	Radiometer America, Inc.
Diagnosics	F. Hoffman-La Roche AG	Radiometer Medical A/S
Beckman Coulter K.K.	Fort Dodge Animal Health	Replidyne
(Japan) Bio-Development	General Hospital Vienna (Austria)	Roche Diagnostics
SRL	Gen-Probe	GmbH Roche
Bio-Inova Life Sciences	GlaxoSmithKline	Diagnosics, Inc. Roche
International	Greiner Bio-One Inc.	Laboratories (Div.
Bio-Inova Life Sciences North	Helena Laboratories	Hoffmann-La Roche Inc.)
America	Home Diagnostics, Inc.	Sarstedt, Inc.
BioMedia Laboratories Sdn Bhd	IGEN Inc.	SARL Laboratoire Carron
BioMérieux (NC)	Immunicon Corporation	(France) Schering Corporation
bioMérieux, Inc. (MO)	Instrumentation Laboratory	Schleicher & Schuell,
Biometrology Consultants	International Technidyne Corporation	Inc. Second Opinion
Bio-Rad Laboratories,	IntraBiotics Pharmaceuticals, Inc.	Showa Yakuhin Kako Company,
Inc.	I-STAT Corporation	Ltd.
Bio-Rad Laboratories, Inc. - France	Johnson and Johnson Pharmaceutical	Streck Laboratories,
Biotest AG	Research and Development, L.L.C.	Inc. SurroMed, Inc.
Blaine Healthcare Associates,	Kendall Sherwood-Davis & Geck	Synermed Diagnostic Corp.
Inc. Bristol-Myers Squibb	LAB-Interlink, Inc.	Sysmex Corporation
Company Canadian External	Laboratory Specialists, Inc.	(Japan)
Quality	Labtest Diagnostica S.A.	Sysmex Corporation
Assessment Laboratory	LifeScan, Inc. (a Johnson &	(Long Grove, IL)
Capital Management Consulting,	Johnson Company)	The Clinical Microbiology
Inc.	Lilly Research Laboratories	Institute The Toledo Hospital
Carl Schaper	Macemon Consultants	(OH)
Checkpoint Development Inc.	Medical Device Consultants, Inc.	Theravance Inc.
Chiron Corporation	Merck & Company, Inc.	Transasia Engineers
ChromaVision Medical	Minigrip/Zip-Pak	Trek Diagnostic Systems,
Systems, Inc.	Molecular Diagnostics, Inc.	Inc. Versicor, Inc.
Chronolab Ag	mvi Sciences (MA)	Vetoquinol S.A.
Clinical Design Group Inc.	Nabi	Visible Genetics,
Clinical Laboratory	Nichols Institute Diagnostics	Inc. Vysis, Inc.
Improvement	(Div. of Quest Diagnostics, Inc.)	Wallac Oy
Consultants	NimbleGen Systems, Inc.	Wyeth-Ayerst
Cognigen	Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.	Xyletech Systems,
Community Medical Center	Nippon Becton Dickinson Co., Ltd.	Inc. YD Consultant
(NJ)	Norfolk Associates, Inc.	YD Diagnostics (Seoul, Korea)
Control Lab (Brazil)	Novartis Pharmaceuticals Corporation	
Copan Diagnostics Inc.	Ortho-Clinical Diagnostics, Inc.	<b>Associações Comerciais</b>
Cosmetic Ingredient	(Raritan, NJ)	AdvaMed
Review	Ortho-Clinical Diagnostics, Inc.	Association of Medical
Cubist Pharmaceuticals	(Rochester, NY)	Diagnostic Manufacturers
Dade Behring Inc. - Deerfield, IL	Oxoid Inc.	Japan Association Clinical
Dade Behring Inc. - Glasgow,	Paratek Pharmaceuticals	Reagents Ind. (Tokyo, Japan)
DE Dade Behring Inc. -	Pfizer Inc	Medical Industry Association
Marburg, Germany	Pharmacia Corporation	of Australia
Dade Behring Inc. - Sacramento,	Philips Medical Systems	
CA Dade Behring Inc. - San Jose,	Powers Consulting Services	<b>Membros Associados Ativos</b>
CA David G. Rhoads Associates,	Premier Inc.	31 <sup>st</sup> Medical Group/SGSL (APO,
Inc. Diagnostics Consultancy	Procter & Gamble	AE)
Diagnostic Products	Pharmaceuticals, Inc.	67 <sup>th</sup> CSH Wuerzburg, GE (NY)
Corporation Eiken Chemical	The Product Development Group	121 <sup>st</sup> General Hospital (CA)
Company, Ltd. Elan	QSE Consulting	Academisch Ziekenhuis-
Pharmaceuticals	Quintiles, Inc.	VUB
Electa Lab s.r.l.		(Belgium)
Enterprise Analysis		
Corporation Essential		

Acadiana Medical Laboratories, LTD (LA)  
Adena Regional Medical Center (OH)  
Advocate Healthcare Lutheran General (IL)  
Akershus Central Hospital and AFA (Norway)  
Albemarle Hospital (NC)  
Allegheny General Hospital (PA)  
Allina Health System (MN)  
Alton Ochsner Medical Foundation (LA)  
Antwerp University Hospital (Belgium)  
Arkansas Department of Health  
ARUP at University Hospital (UT)  
Armed Forces Research Institute of Medical Science (APO, AP)  
Associated Regional & University Pathologists (UT)  
Aurora Consolidated Laboratories (WI)  
Azienda Ospedale Di Lecco (Italy)  
Bay Medical Center (MI)  
Baystate Medical Center (MA)  
Bbaguas Duzen Laboratories (Turkey)  
Bermuda Hospitals Board  
Bo Ali Hospital (Iran)  
Brooks Air Force Base (TX)  
Broward General Medical Center (FL)  
Cadhams Provincial Laboratory  
Calgary Laboratory Services  
Carilion Consolidated Laboratory (VA)  
Cathay General Hospital (Taiwan)  
Central Peninsula General Hospital (AK)  
Central Texas Veterans Health Care System  
Centre Hospitalier Regional del la Citadelle (Belgium)  
Centro Diagnostico Italiano (Milano, Italy)  
Champlain Valley Physicians Hospital (NY)  
Chang Gung Memorial Hospital (Taiwan)  
Changi General Hospital (Singapore)  
The Charlotte Hungerford Hospital (CT)  
Children's Hospital (LA)  
Children's Hospital (NE)  
Children's Hospital & Clinics (MN)  
Children's Hospital Medical Center (Akron, OH)  
Children's Hospital of Philadelphia (PA)  
Children's Medical Center of Dallas (TX)  
Clarian Health–Methodist Hospital (IN)  
Clendo Lab (Puerto Rico)  
Clinical Laboratory Partners, LLC (CT)  
CLSI Laboratories (PA)  
Columbia Regional Hospital (MO)  
Commonwealth of Kentucky  
Community Hospital of Lancaster (PA)  
CompuNet Clinical Laboratories (OH)  
Cook County Hospital (IL)  
Cook Children's Medical Center (TX)  
Covance Central Laboratory Services (IN)  
Danish Veterinary Laboratory (Denmark)  
Danville Regional Medical Center (VA)  
Delaware Public Health Laboratory  
Department of Health & Community Services (New Brunswick, Canada)  
DesPeres Hospital (MO)  
DeTar Hospital (TX)  
Detroit Health Department (MI)  
Diagnosticos da América S/A (Brazil)  
Dr. Everett Chalmers Hospital (New Brunswick, Canada)  
Doctors Hospital (Bahamas)  
Duke University Medical Center (NC)  
Dwight David Eisenhower Army Med. Ctr. (GA)  
E.A. Conway Medical Center (LA)  
Eastern Maine Medical Center  
East Side Clinical Laboratory (RI)  
Eastern Health (Vic., Australia)  
Elyria Memorial Hospital (OH)  
Emory University Hospital (GA)  
Esoterix Center for Infectious Disease (TX)  
Fairview-University Medical Center (MN)  
Federal Medical Center (MN)  
Florida Hospital East Orlando  
Focus Technologies (CA)  
Foothills Hospital (Calgary, AB, Canada)  
Fresenius Medical Care/Spectra East (NJ)  
Fresno Community Hospital and Medical Center  
Frye Regional Medical Center (NC)  
Gambro BCT (CO)  
Geisinger Medical Center (PA)  
Grady Memorial Hospital (GA)  
Guthrie Clinic Laboratories (PA)  
Hahnemann University Hospital (PA)  
Harris Methodist Erath County (TX)  
Harris Methodist Fort Worth (TX)  
Hartford Hospital (CT)  
Headwaters Health Authority (Alberta, Canada)  
Health Network Lab (PA)  
Health Partners Laboratories (VA)  
Heartland Regional Medical Center (MO)  
Highlands Regional Medical Center (FL)  
Hoag Memorial Hospital Presbyterian (CA)  
Holmes Regional Medical Center (FL)  
Holzer Medical Center (OH)  
Hopital du Sacre-Coeur de Montreal (Montreal, Quebec, Canada)  
Hôpital Maisonneuve – Rosemont (Montreal, Canada)  
Hospital for Sick Children (Toronto, ON, Canada)  
Hospital Sousa Martins (Portugal)  
Hotel Dieu Hospital (Windsor, ON, Canada)  
Houston Medical Center (GA)  
Huddinge University Hospital (Sweden)  
Hurley Medical Center (MI)  
Indiana University  
Innova Fairfax Hospital (VA)  
Institute of Medical and Veterinary Science (Australia)  
International Health Management

Associates, Inc. (IL)  
 Jackson Memorial Hospital  
 (FL) Jersey Shore Medical  
 Center (NJ) John C. Lincoln  
 Hospital (AZ) John F. Kennedy  
 Medical Center  
 (NJ)  
 John Peter Smith Hospital (TX)  
 Kadlec Medical Center (WA)  
 Kaiser Permanente Medical  
 Care  
 (CA)  
 Kaiser Permanente (MD)  
 Kantonsspital  
 (Switzerland)  
 Keller Army Community Hospital  
 (NY)  
 Kenora-Rainy River Regional  
 Laboratory Program (Ontario,  
 Canada)  
 Kern Medical Center (CA)  
 Kimball Medical Center (NJ)  
 King Faisal Specialist  
 Hospital  
 (Saudi Arabia)  
 King Khalid National Guard  
 Hospital (Saudi Arabia)  
 King's Daughter Medical Center  
 (KY)  
 Klinični Center (Slovenia)  
 Laboratories at Bonfils (CO)  
 Laboratoire de Santé Publique du  
 Quebec (Canada)  
 Laboratório Fleury S/C Ltda.  
 (Brazil)  
 Laboratory Corporation of America  
 (NJ)  
 Laboratory Corporation of  
 America (MO)  
 LAC and USC Healthcare  
 Network (CA)  
 Lakeland Regional Medical Center  
 (FL)  
 Lancaster General Hospital (PA)  
 Langley Air Force Base (VA)  
 LeBonheur Children's  
 Medical Center (TN)  
 L'Hotel-Dieu de Quebec (Canada)  
 Libero Istituto Univ. Campus  
 BioMedico (Italy)  
 Louisiana State University  
 Medical Center  
 Maccabi Medical Care and Health  
 Fund (Israel)  
 Malcolm Grow USAF Medical  
 Center (MD)  
 Martin Luther King/Drew Medical  
 Center (CA)

Massachusetts General Hospital  
 (Microbiology Laboratory)  
 MDS Metro Laboratory Services  
 (Burnaby, BC, Canada)  
 Medical College of Virginia  
 Hospital  
 Medicare/Medicaid Certification,  
 State of North Carolina  
 Memorial Hospital at Gulfport (MS)  
 Memorial Medical Center (IL)  
 Memorial Medical Center (LA)  
 Jefferson Davis Hwy  
 Memorial Medical Center (LA)  
 Napoleon Avenue  
 Mercy Medical Center (IA)  
 Methodist Hospital (TX)  
 Methodist Hospitals of Memphis  
 (TN)  
 MetroHealth Medical Center (OH)  
 Michigan Department of  
 Community Health  
 Mississippi Baptist Medical Center  
 Monte Tabor – Centro Italo -  
 Brasileiro de Promocao (Brazil)  
 Montreal Children's Hospital  
 (Canada)  
 Montreal General Hospital  
 (Canada)  
 MRL Pharmaceutical Services, Inc.  
 (VA)  
 Nassau County Medical Center  
 (NY)  
 National Institutes of Health (MD)  
 Naval Hospital – Corpus Christi  
 (TX)  
 Naval Surface Warfare Center (IN)  
 Nebraska Health System  
 New Britain General Hospital (CT)  
 New England Fertility Institute  
 (CT)  
 New Mexico VA Health Care  
 System  
 New York University Medical  
 Center  
 North Carolina State Laboratory of  
 Public Health  
 North Shore – Long Island Jewish  
 Health System Laboratories (NY)  
 North Shore University Hospital  
 (NY)  
 Northwestern Memorial Hospital  
 (IL)  
 O.L. Vrouwziekenhuis (Belgium)  
 Ordre professionnel des  
 technologues médicaux du  
 Québec  
 Ospedali Riuniti (Italy)  
 The Ottawa Hospital  
 (Ottawa, ON, Canada)  
 Our Lady of Lourdes Hospital (NJ)  
 Our Lady of the Resurrection  
 Medical Center (IL)  
 Pathology and Cytology  
 Laboratories, Inc. (KY)  
 Pathology Associates Medical  
 Laboratories (WA)  
 The Permanente Medical Group  
 (CA)  
 Piedmont Hospital (GA)  
 Pikeville Methodist Hospital (KY)  
 Pocono Hospital (PA)  
 Presbyterian Hospital of Dallas  
 (TX)  
 Providence Health Care  
 Queen Elizabeth Hospital (Prince  
 Edward Island, Canada)  
 Queensland Health Pathology  
 Services (Australia)  
 Quest Diagnostics Incorporated  
 (CA)  
 Quintiles Laboratories, Ltd. (GA)  
 Regions Hospital  
 Reid Hospital & Health Care  
 Services (IN)  
 Research Medical Center  
 (MO) Rex Healthcare (NC)  
 Rhode Island Department of Health  
 Laboratories  
 Riyadh Armed Forces Hospital  
 (Saudi Arabia)  
 Royal Columbian Hospital (New  
 Westminster, BC, Canada)  
 Sacred Heart Hospital (MD)  
 Saint Mary's Regional  
 Medical  
 Center (NV)  
 St. Alexius Medical Center  
 (ND) St. Anthony Hospital  
 (CO)  
 St. Anthony's Hospital (FL)  
 St. Barnabas Medical Center  
 (NJ) St-Eustache Hospital  
 (Quebec,  
 Canada)  
 St. Francis Medical Ctr.  
 (CA) St. John Hospital and  
 Medical  
 Center (MI)  
 St. John Regional Hospital (St.  
 John, NB, Canada)  
 St. Joseph Hospital (NE)  
 St. Joseph's Hospital – Marshfield  
 Clinic (WI)  
 St. Joseph's Medical Center  
 (NY) St. Joseph Mercy  
 Hospital (MI) St. Jude

Children's Research Hospital (TN)	(Belgium)
St. Luke's Regional Medical Center (IA)	University Hospitals of Cleveland (OH)
St. Mary of the Plains Hospital (TX)	The University Hospitals (OK)
St. Mary's Hospital & Medical Center (CO)	University of Alabama-Birmingham Hospital
St. Vincent Medical Center (CA)	University of Alberta Hospitals (Canada)
Ste. Justine Hospital (Montreal, PQ, Canada)	University of Colorado Health Science Center
Salina Regional Health Center (KS) San Francisco General Hospital (CA)	University of Chicago Hospitals (IL)
Santa Clara Valley Medical Center (CA)	University of Illinois Medical Center
Seoul Nat'l University Hospital (Korea)	University of the Ryukyus (Japan)
Shanghai Center for the Clinical Laboratory (China)	University of Texas M.D. Anderson Cancer Center
South Bend Medical Foundation (IN)	University of Virginia Medical Center
Southwest Texas Methodist Hospital (TX)	University of Washington
South Western Area Pathology Service (Australia)	UZ-KUL Medical Center (Belgium)
Southern Maine Medical Center	VA (Denver) Medical Center (CO)
Specialty Laboratories, Inc. (CA)	Virginia Department of Health
Stanford Hospital and Clinics (CA)	VA (Hines) Medical Center
State of Washington Department of Health	VA (Kansas City) Medical Center (MO)
Stony Brook University Hospital (NY)	VA (Western NY) Healthcare System
Stormont-Vail Regional Medical Center (KS)	VA (San Diego) Medical Center (CA)
Sun Health-Boswell Hospital (AZ)	VA (Tuskegee) Medical Center (AL)
Swedish Medical Center – Providence Campus (WA) Tampa General Hospital (FL) Temple University Hospital (PA) Tenet Odessa Regional Hospital (TX)	VA Outpatient Clinic (OH)
The Toledo Hospital (OH)	Vejle Hospital (Denmark)
Touro Infirmary (LA)	Washington Adventist Hospital (MD)
Trident Regional Medical Center (SC)	Washoe Medical Center Laboratory (NV)
Tripler Army Medical Center (HI)	West Jefferson Medical Center (LA)
Truman Medical Center (MO)	West Shore Medical Center (MI)
UCSF Medical Center (CA)	Wilford Hall Medical Center (TX)
UNC Hospitals (NC)	William Beaumont Army Medical Center (TX)
University College Hospital (Galway, Ireland)	William Beaumont Hospital (MI)
University Hospital (Gent)	William Osler Health Centre (Brampton, ON, Canada)
	Williamsburg Community Hospital (VA)
	Winn Army Community Hospital (GA)
	Winnipeg Regional Health Authority (Winnipeg, Canada)
	Wishard Memorial Hospital (IN)
	Yonsei University College of Medicine (Korea)
	York Hospital (PA)

## MEMBROS DA DIRETORIA

### Executivos

Donna M. Meyer, Ph.D., Presidente  
CHRISTUS Health

Susan Blonshine, RRT, RPFT,  
FAARC TechEd

Tadashi Kawai, M.D., Ph.D.  
International Clinical Pathology  
Center

Thomas L. Hearn, Ph.D.,  
Presidente Eleito  
Centers for Disease Control and  
Prevention

Wayne Brinster  
BD

J. Stephen Kroger, M.D., MACP  
COLA

Emil Voelkert, Ph.D.,  
Secretário  
Roche Diagnostics GmbH

Kurt H. Davis, FCSMLS, CAE  
Canadian Society for Medical  
Laboratory Science

Willie E. May, Ph.D  
National Institute of Standards and  
Technology

Gerald A. Hoeltge, M.D.,  
Tesoureiro  
The Cleveland Clinic Foundation

Lillian J. Gill, M.S.  
FDA Center for Devices and  
Radiological Health

Gary L. Myers, Ph.D.  
Centers for Disease Control and  
Prevention

F. Alan Andersen, Ph.D.,  
Presidente Imediatamente Anterior  
Cosmetic Ingredient Review

Robert L. Habig, Ph.D.  
Habig Consulting Group

Barbara G. Painter, Ph.D.  
Pharma Micro Consultancy, LLC

John V. Bergen, Ph.D.,  
Diretor Executivo

Carolyn D. Jones, J.D., M.P.H.  
AdvaMed

Judith A. Yost, M.A., M.T.(ASCP)  
Centers for Medicare & Medicaid  
Services

## Sumário

Resumo

Membros Ativos do Comitê

Prefácio

Resumo das Principais Mudanças neste Documento

Declaração da Missão do Subcomitê do NCCLS para Testes de sensibilidade Antimicrobiana

Norma Precauções

Enfoque de Sistema de Qualidade

- 1 Introdução
  - 1.1 Abrangência
  - 1.2 Definições
- 2 Indicações para a Realização de Testes de Sensibilidade
- 3 Seleção do Disco de Agente Antimicrobiano para Testes e Relatórios Rotineiros
  - 3.1 Relatórios Rotineiros
  - 3.2 Nomes Genéricos
  - 3.3 Diretrizes de Seleção
  - 3.4 Diretrizes Sugeridas para Testes e Relatórios Seletivos e Rotineiros
- 4 Reagentes para os Testes de Difusão em Disco
  - 4.1 Meio de Ágar Müller-Hinton
  - 4.2 Armazenamento dos Discos de Antimicrobianos
  - 4.3 Controle de Turbidez para a Preparação do Inóculo
- 5 Procedimentos para a Execução de Testes de Disco-Difusão
  - 5.1 Preparação do Inóculo
  - 5.2 Inoculação das Placas de Teste
  - 5.3 Aplicação dos Discos às Placas Inoculadas de Ágar
  - 5.4 Leitura das Placas e Interpretação dos Resultados
- 6 Organismos Fastidiosos
  - 6.1 *Haemophilus* spp.
  - 6.2 *Neisseria gonorrhoeae*
  - 6.3 *Streptococcus pneumoniae* e outros *Streptococcus* spp.
- 7 Organismos-Problemas
  - 7.1 Estafilococos
  - 7.2 Enterococos
  - 7.3 Bacilos Gram-Negativos produtores de  $\beta$ -Lactamase de Espectro Ampliado

xv

## Sumário (Continuação)

- 8 Testes de  $\beta$ -Lactamase
  - 8.1 Finalidade
  - 8.2 Seleção do Teste de  $\beta$ -Lactamase
- 9 Interpretação dos Resultados dos Testes de Difusão em Disco
  - 9.1 Padrões de Interpretação dos Halos de Inibição
  - 9.2 Categorias de Interpretação
  - 9.3 Pontos de Corte Equivalentes às CIMs
- 10 Controle de Qualidade
  - 10.1 Finalidade
  - 10.2 Cepas de Referência para o Controle de Qualidade
  - 10.3 Armazenamento das Cepas de Controle de Qualidade
  - 10.4 Limites dos Halos de Inibição para os Controles de Qualidade
  - 10.5 Frequência dos Testes de Controle de Qualidade
  - 10.6 Ação Corretiva
  - 10.7 Relatando Resultados Clínicos Quando Ocorrem Testes Fora-dos-Padrões
  - 10.8 Verificação dos Resultados dos Pacientes
- 11 Limitações dos Métodos de Disco-Difusão
  - 11.1 Aplicação aos Vários Grupos de Organismos
  - 11.2 Resultados Não Confiáveis
  - 11.3 Surgimento de Resistência

Referências Bibliográficas

Apêndice A. Fluxogramas dos Protocolos de Controle de Qualidade

Resumo dos Comentários e das Respostas do Subcomitê

Publicações do NCCLS Afins

## Prefácio

Nesta revisão de 2003 do documento M2—Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão do NCCLS foram acrescentadas ou revisadas várias seções. Em particular, acrescentou-se uma nova seção sobre a verificação dos resultados incomuns de pacientes, relacionada na nova tabela 4 da Norma M100. A seção sobre Controle de Qualidade detalha agora os critérios para uma opção de 20 ou 30 dias de testes para converter os testes de controle de qualidade de diários para semanais. Incluiu-se, neste documento, a versão mais recente das tabelas M100 (M100-S13), publicadas separadamente nos anos que intercedem à revisão do texto, a fim de assegurar que os usuários estão cientes das diretrizes mais recentes do subcomitê relativas a ambos os métodos e as informações tabulares, apresentadas normalmente nas tabelas anuais. O suplemento M100-S14 será atualizado durante as reuniões do subcomitê ao longo de 2003 e publicados novamente, como documento separado, em janeiro de 2004.

Há muitas outras mudanças editoriais e metodológicas nesta edição da M2, resultantes das reuniões do Subcomitê para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana, realizadas a partir de 2000, e várias mudanças nas tabelas da M100 ocorridas no último ano. As mudanças específicas nas tabelas M100 encontram-se resumidas no início do suplemento M100-S13, inserido neste documento. As mudanças mais importantes no documento da Norma M2 são apresentadas, em forma resumida, a seguir.

Foi uma honra presidir o Subcomitê para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana durante os últimos seis anos. Muitos membros do subcomitê (que agora totaliza mais de 180 voluntários, incluindo membros, assessores e observadores) foram indispensáveis para a elaboração desses documentos. Além disso, gostaria de agradecer aos presidentes dos grupos de trabalho do Subcomitê para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana por suas valiosas contribuições durante os três últimos anos. Dentre eles, gostaria de mencionar Karen Bush (Grupo de Trabalho para ESBL); Frank Cockerill (Grupo de Trabalho para Agentes de Bioterrorismo); Sharon Cullen (Grupo de Trabalho para Controle de Qualidade); Dwight Hardy (Grupo de Trabalho para *Stenotrophomonas* e *Burkholderia*); Janet Hindler (Grupo de Trabalho M39 para Análise e Apresentação de Dados Cumulativos de Testes de Sensibilidade Antimicrobiana); David Hecht (Metodologia dos Testes de Sensibilidade Antimicrobiana para Bactérias Anaeróbicas); Jana Swenson (Grupo de Trabalho de Revisão de Textos); Fred Tenover (Grupos de Trabalho para Organismos Fastidiosos e Estafilococos); e Matt Wikler (Grupo de Trabalho para Enterobactérias e M23—Desenvolvimento de Critérios e Parâmetros de Controle de Qualidade para Testes de Sensibilidade *In Vitro*).

Mary Jane Ferraro, Ph.D., M.P.H.

*Presidente, Subcomitê para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana*

## Resumo das Principais Mudanças no Documento

### Acréscimos ao documento

Localização	Informação acrescentada
Seção 3.2.1.3	Texto adicional sobre as classes e subclasses de antimicrobianos cefens.
Seção 3.2.5	Texto adicional sobre a sensibilidade à tetraciclina.
Seção 4.1.4	Texto adicional sobre o CQ de sulfonamidas e trimetoprim.
Seção 6.1.1	Acréscimo de recomendações sobre CQ para <i>Haemophilus influenzae</i> .
Seção 7.1.1, 3º marcador	Texto adicional de como reportar isolados MRS.
Seção 7.1.2	Texto adicional sobre sensibilidade diminuída à vancomicina e incubação.
Seção 7.1.2	Texto adicional sobre cepa de <i>S. aureus</i> resistente à vancomicina.
Seção 7.2.1	Texto adicional sobre testes de $\beta$ -lactamase positivos.
Seção 10.3	Acréscimo de comentário sobre como manter os organismos.
Seção 10.3, 3º marcador	Texto adicional sobre o subcultivo de cepas-controle em uso.
Seção 10.5.2.1	Texto para a opção de CQ de 20 dias.
Seção 10.6.2.2	Texto para a opção de CQ de 20 dias.
Seção 10.8	Nova seção sobre a verificação dos resultados dos pacientes.
Seção 11.3	Texto adicional sobre repetição de testes.
Seção 5.4 (1)	Mudança na redação do texto sobre os testes de oxacilina e vancomicina.
Seção 5.4 (2)	Mudança na redação no texto sobre o crescimento de colônias dentro do halo de inibição.
Seção 7.1.1, 5º marcador	Mudança na redação do texto sobre estafilococos resistentes à meticilina.

### Foram Excluídos deste Documento

Seção 10.4	Medidas de controle de qualidade.
------------	-----------------------------------

É importante que os usuários das normas M2-A8 e M7-A6 reconheçam que os dispositivos comerciais para testar a sensibilidade não são discutidos nessas normas/padrões. Os métodos descritos no presente documento são procedimentos de referência genéricos, que podem ser usados para testes de sensibilidade de rotina nos laboratórios de patologia clínica para avaliar os dispositivos comerciais quando se contempla o uso rotineiro dos mesmos. Os resultados gerados com os métodos de referência do NCCLS são utilizados pelo United States Food and Drug Administration-FDA para avaliar o desempenho dos sistemas comerciais antes de serem liberados para venda nos Estados Unidos. A liberação pelo FDA indica que a agência concluiu que aquele dispositivo comercial fornece resultados de sensibilidade substancialmente equivalentes aos gerados usando os métodos de referência do NCCLS para os organismos e agentes antimicrobianos descritos na bula do fabricante, que acompanha o produto. Alguns laboratórios poderão achar que métodos dilucionais comerciais, ou aqueles que utilizam as metodologias de gradiente de antibiótico, calorimétrico, turbidimétrico, fluorométrico, ou outros são apropriados e factíveis para uso específico ou rotineiro.

**Missão do Subcomitê para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana do NCCLS – O** Subcomitê para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana do NCCLS é constituído por representantes da área da saúde, dos governos e da indústria, incluindo laboratórios de microbiologia, agências governamentais, provedores de atenção à saúde e educadores, e as indústrias farmacêuticas e de microbiologia diagnóstica. Usando o processo de consenso do NCCLS, o subcomitê desenvolve normas/padrões que promovem testes de sensibilidade antimicrobiana acurados e relatórios apropriados.

A missão do Subcomitê para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana do NCCLS é:

- desenvolver métodos de referência padronizados para os testes de sensibilidade antimicrobiana;
- fornecer parâmetros de controle de qualidade para os testes padronizados;
- estabelecer critérios interpretativos para os resultados dos testes de sensibilidade antimicrobiana realizados usando testes padronizados;
- sugerir estratégias para os testes e relatórios que sejam clinicamente relevantes e custo-eficazes;
- refinar, em base permanente, as normas/padrões e otimizar a detecção de mecanismos de resistência emergente mediante o desenvolvimento de métodos novos ou revisados, critérios de interpretação e parâmetros de controle de qualidade;
- educar os usuários, através da comunicação multimídia, acerca das normas/padrões e diretrizes; e
- promover o diálogo com os usuários desses métodos e aqueles que os aplicam.

O propósito último da missão do subcomitê é fornecer informações úteis que permitam que os laboratórios ajudem o clínico na seleção da terapia antimicrobiana mais adequada clinicamente. As normas/padrões e diretrizes devem ser abrangentes e incluir todos os agentes antimicrobianos, cujos dados atendam às diretrizes estabelecidas pelo NCCLS. Os valores que norteiam essa missão são qualidade, precisão, equidade, oportunidade, trabalho de equipe, consenso e confiança.

## **Precauções-Padrão**

Sendo impossível, com freqüência, saber o que é infeccioso, todos os espécimes de sangue humano devem ser tratados como infecciosos e manuseados de acordo com as “precauções- padrão”. Essas são as novas diretrizes combinando as características principais das práticas de “isolamento de substâncias corpóreas às precauções universais. As precauções padronizadas cobrem a transmissão de qualquer patógeno e, por isso, são mais abrangentes do que as precauções universais, que visam apenas aos patógenos transmitidos pelo sangue. As diretrizes relativas às precauções padrão e precauções universais são disponibilizadas pelo U.S. Centers for Disease Control and Prevention (*Guideline for Isolation Precautions in Hospitals*. Infection Control and Hospital Epidemiology. CDC. 1996;Vol 17;1:53-80), (MMWR 1987;36[suppl 2S]2S-18S) e (MMWR 1988;37:377-382, 387-388). No caso de precauções específicas para a prevenção da transmissão laboratorial de infecções transmitidas pelo sangue de instrumentos e materiais de laboratório, assim como as recomendações relativas à conduta de exposições a sangue, favor reportar-se à edição mais recente do documento M29—*Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections* do NCCLS.

## **Palavras-Chave**

Difusão em ágar, antibiótico, agentes antimicrobianos, disco-difusão, método de Kirby-Bauer, teste de sensibilidade.

## Enfoque do Sistema de Qualidade

O NCCLS endossa o enfoque de sistema de qualidade para o desenvolvimento de normas/padrões e diretrizes, visto que facilita a gestão de projetos; define a estrutura dos documentos por meio de um gabarito; e fornece um processo para identificar os documentos necessários que faltaram utilizando a análise de lacunas (*gap analysis*). O enfoque baseia-se no modelo apresentado na edição mais recente do documento HS1—*A Quality System Model for Health Care* do NCCLS. O enfoque de sistema de qualidade aplica-se a um conjunto central de “elementos essenciais dos sistemas de qualidade (EEQs),” básicos a qualquer organização, a todas as operações, em qualquer etapa de qualquer fluxograma, dos serviços de atenção à saúde. Os EEQs fornecem um arcabouço para a provisão de qualquer tipo de produto ou serviço, servindo como guia de gerenciamento. Os elementos essenciais dos sistemas de qualidade (EEQs) são os seguintes.

	EEQs
Documentos e Registros	Gestão da Informação
Organização	Gestão de Ocorrências
Pessoal	Avaliação
Equipamento	Aprimoramento de Processos
Compras e Inventário	Serviços e Satisfação
Controle dos Processos	Instalações e Segurança

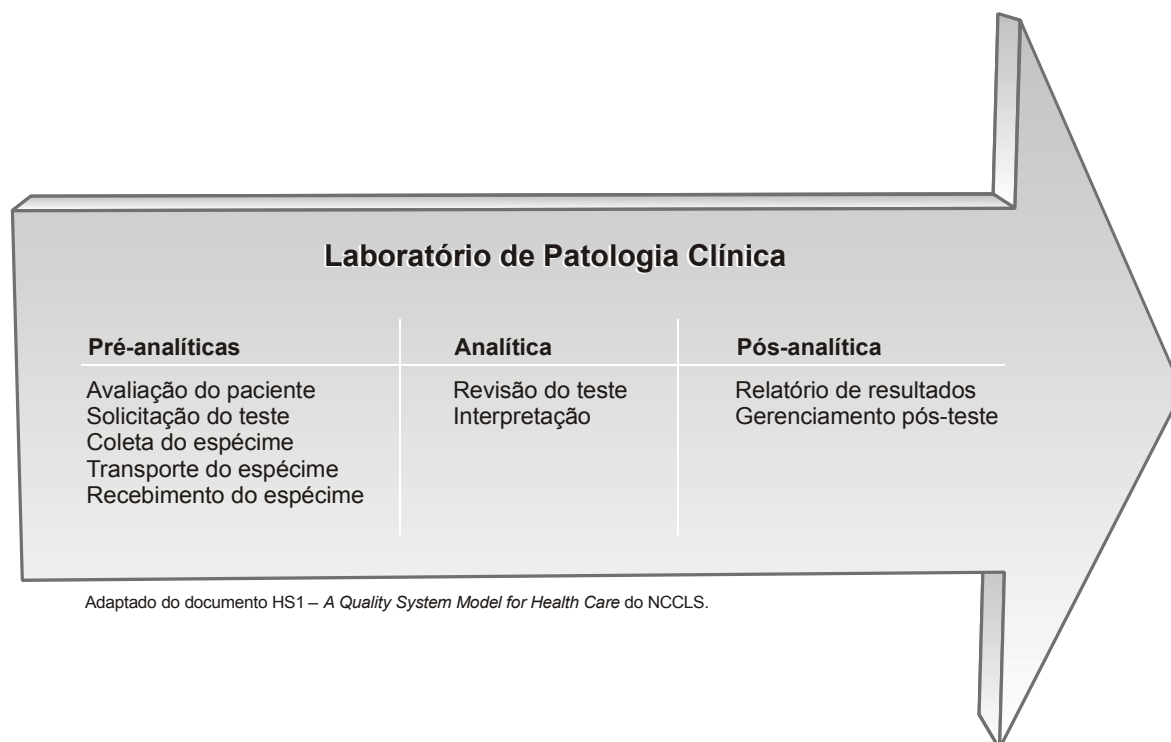
A Norma M2-A8 trata dos seguintes elementos essenciais dos sistemas de qualidade (EEQs):

Documentos e Registros	Organização	Pessoal	Equipamento	Compras e Inventário	Controle dos Processos	Gestão da Informação	Gestão de Ocorrências	Avaliação	Aprimoramento de Processos	Serviços e Satisfação	Instalações e Segurança
					X						

Adaptada do documento HS1—*A Quality System Model for Health Care* do NCCLS.

### Etapas do Fluxograma

Uma etapa do fluxograma contém a descrição dos passos necessários para prover um determinado produto ou serviço fornecido pela organização ou entidade. Por exemplo, a Norma GP26-A2 define as etapas do fluxograma dos laboratórios clínicos que consiste em três passos seqüenciais: pré-analítico, analítico e pós-analítico. Todos os laboratórios clínicos seguem esses três processos para prestar serviços laboratoriais, denominados informações laboratoriais de qualidade. A seta mostra a seqüência, da esquerda para a direita, que todo laboratório clínico segue. Além disso, os passos ou subprocessos necessários encontram-se relacionados logo abaixo do fluxograma.



A maioria dos documentos do NCCLS está relacionada com os laboratórios de patologia clínica, de maneira que a etapa mais comum do fluxograma pode ser representada conforme visto anteriormente. As etapas do fluxograma relativas a outras atividades de atenção à saúde, ex., serviços de terapia respiratória, serviços de imagens, etc., ou a outros tipos de organizações, ex., fabricantes de dispositivos médicos, irão diferir daquelas dos laboratórios de patologia clínica. Toda etapa do fluxograma descreve a seqüência das atividades necessárias à produção dos produtos ou serviços de uma organização ou entidade específica. Para aqueles documentos relacionados com outras etapas do fluxograma, o ícone refletirá os diferentes passos do processo.

A Norma M2-A8 trata das etapas indicadas na etapa de fluxograma dos laboratórios de patologia clínica:

<b>Pré-analíticos</b>					<b>Analíticos</b>		<b>Pós-analíticos</b>	
Avaliação do Paciente	Solicitação do Teste	Coleta do Espécime	Transporte do Espécime	Recebimento do Espécime	Revisão do Teste	Interpretação Laboratorial	Relatório de Resultados	Gerenciamento do Espécime Pós-teste
					X	X	X	

Adaptado do documento HS1— A Quality System Model for Health Care do NCCLS.

# Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão; Norma Aprovada—Oitava Edição

## 1. Introdução

Diversos métodos laboratoriais podem ser empregados para prever a sensibilidade *in vitro* de bactérias aos agentes antimicrobianos. Muitos laboratórios de microbiologia clínica usam, de forma rotineira, o método de disco-difusão em ágar para testar patógenos comuns de crescimento rápido e certas bactérias fastidiosas. O presente documento descreve a execução, as aplicações e as limitações do método padronizado de disco-difusão. As recomendações do International Collaborative Study (ICS)<sup>1</sup> e os regulamentos<sup>3</sup> propostos pelo United States Food and Drug Administration (U.S. FDA) foram revisados, sendo que seções pertinentes foram incorporadas à presente norma. Existem outros métodos de sensibilidade, os quais fornecem resultados essencialmente equivalentes aos métodos do NCCLS descritos neste documento. O FDA é responsável pela aprovação de dispositivos comerciais para uso nos Estados Unidos. O NCCLS não aprova ou endossa produtos ou dispositivos comerciais.

Os testes de disco-difusão baseados apenas na presença ou ausência de um halo de inibição, sem consideração do tamanho do halo, não são aceitáveis. Só podem ser obtidos resultados confiáveis com testes de disco-difusão que usam o princípio de metodologia padronizada e medidas do diâmetro do halo de inibição correlacionados às concentrações inibitórias mínimas (CIMs) com cepas reconhecidamente sensíveis e resistentes a diversos agentes antimicrobianos.

Os métodos aqui descritos devem ser seguidos explicitamente para se obter resultados reprodutíveis. O método padronizado recomendado atualmente pelo Subcomitê para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana do NCCLS baseia-se no método descrito originalmente por Bauer *et al.*<sup>4</sup> Esse é o método de disco-difusão mais completamente descrito para o qual foram desenvolvidos padrões de interpretação apoiados por dados laboratoriais e clínicos.

O presente documento descreve os métodos, o controle de qualidade e os critérios de interpretação recomendados atualmente para os testes de sensibilidade por disco-difusão. Mudanças serão incorporadas em futuras edições desta norma quando novos problemas forem identificados ou melhorias nesses critérios forem desenvolvidas, além disso, essas mudanças serão divulgadas nos suplementos informativos anuais.

### 1.1 Abrangência

Diversos métodos laboratoriais podem ser usados para prever a sensibilidade *in vitro* de bactérias a agentes antimicrobianos. O presente documento descreve técnicas padronizadas de disco-difusão em ágar a serem utilizadas para determinar a sensibilidade *in vitro* de bactérias de crescimento aeróbico. O documento ainda contempla a preparação das placas de ágar, as condições do teste (incluindo o preparo e tamanho do inóculo, o tempo de incubação e a temperatura), a interpretação dos resultados, dos procedimentos de controle de qualidade e das limitações do método de disco-difusão. Para auxiliar os laboratórios clínicos, apresentam-se diretrizes para a seleção dos agentes antimicrobianos para a realização de testes rotineiros e respectivos relatórios. Os padrões dos testes de sensibilidade *in vitro* das bactérias que apresentam crescimento aeróbico usando métodos dilucionais podem ser encontrados na edição mais recente do documento M7—*Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically* do NCCLS. Os testes padronizados de sensibilidade *in vitro* das bactérias que apresentam crescimento anaeróbico podem ser encontrados na edição mais recente do documento recente do documento M11—*Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria* do NCCLS.

## 1.2 Definições<sup>a</sup>

**Categoria de Interpretação do Teste de Sensibilidade Antimicrobiana, n - 1)** Classificação baseada na resposta *in vitro* de um organismo a um agente antimicrobiano nas concentrações séricas ou teciduais que este agente pode alcançar quando as doses habitualmente prescritas deste agente são utilizadas; **2) Categoria de Interpretação ‘Sensível’ do Teste de Sensibilidade Antimicrobiana, n** – Categoria que implica que a infecção causada por este isolado pode ser tratada apropriadamente com a dosagem de um agente antimicrobiano recomendado para esse tipo de infecção e patógeno, salvo quando de outra forma indicado; **3) Categoria de Interpretação ‘Intermediária’ do Teste de Sensibilidade Antimicrobiana, n** – Categoria que implica que uma infecção causada por este isolado pode ser tratada apropriadamente em locais do corpo, onde as drogas se concentram fisiologicamente ou quando for possível a prescrição de uma dosagem mais alta da droga que a habitual; também indica uma “zona tampão” (*buffer zone*) que deveria impedir que pequenos fatores técnicos e fora de controle causem grandes discrepâncias na interpretação dos testes; **4) Categoria de Interpretação ‘Resistente’ do Teste de Sensibilidade Antimicrobiana, n** – Os isolados considerados resistentes não são inibidos pelas concentrações do agente antimicrobiano normalmente prescritas em tratamentos habituais (frequência e dosagem) e/ou caem na faixa em que a ocorrência de mecanismos de resistência antimicrobiana específicos são mais prováveis (ex., beta-lactamases), e a eficácia clínica não tem sido confiável em estudos clínicos.

**Controle de qualidade, n** – Técnicas e atividades operacionais usadas para atender aos requisitos de qualidade.

## 2. Indicações para a Realização de Testes de Sensibilidade

Os testes de sensibilidade são indicados para qualquer organismo que cause um processo infeccioso que requeira terapia antimicrobiana, sempre que sua sensibilidade não possa ser predita de maneira confiável com base na identificação do organismo. Os testes de sensibilidade são indicados, com maior frequência, quando se acredita que o organismo causador da infecção pertence a uma espécie capaz de demonstrar resistência aos agentes antimicrobianos normalmente usados. Os mecanismos de resistência incluem a produção de enzimas que inativam a droga, a alteração dos alvos de ação da droga e alteração da permeabilidade da membrana externa ou efluxo da droga. Alguns organismos ainda possuem sensibilidade previsível a agentes antimicrobianos, e a terapia empírica é amplamente reconhecida. Os testes de sensibilidade são raramente necessários quando a infecção se deve a um microorganismo reconhecidamente sensível a uma droga muito eficaz (ex., isolados de *Streptococcus pyogenes* permanecem sensíveis à penicilina nos Estados Unidos). Se o isolado de *S. pyogenes* for proveniente de pacientes alérgicos à penicilina, a eritromicina ou outros macrolídeos podem ser testados para detectar cepas resistentes a esses agentes. Os testes de sensibilidade também são importantes nos estudos da epidemiologia da resistência e na avaliação de novos agentes antimicrobianos.

Colônias, isoladas em placas de ágar, de cada tipo de organismo que possa desempenhar um papel patogênico devem ter a sua sensibilidade testada. Com frequência, a identificação dos microorganismos é realizada neste momento. Diferentes tipos de microorganismos não devem ser testados em uma mesma placa do teste de sensibilidade. A prática de realizar testes de sensibilidade a partir do material clínico (ex, urina e fluidos corpóreos normalmente estéreis) deve ser evitada, exceto em emergências clínicas, quando a coloração direta do gram sugere um único patógeno. Se o teste for efetuado diretamente com o material clínico, os resultados devem ser reportados como preliminares, repetindo-se o teste de sensibilidade usando a metodologia padronizada. Quando a natureza da infecção não está clara e o espécime contém crescimento misto ou flora normal (em que os organismos provavelmente têm pouca relação com o processo infeccioso que está sendo tratado), os testes de sensibilidade são frequentemente desnecessários e os resultados podem ser não confiáveis.

<sup>a</sup> Algumas dessas definições são encontradas no documento do NCCLS NRSL8—*Terminology and Definitions for Use in NCCLS Documents*. Para definições completas e informações detalhadas sobre as fontes, favor reportar-se à edição mais recente desse documento.

### 3. Seleção do Disco de Agente Antimicrobiano para Testes e Relatórios Rotineiros

Cada laboratório de patologia clínica deve selecionar os agentes antimicrobianos mais apropriados para realizar o teste, em conjunto com os especialistas em doenças infecciosas e o farmacêutico, assim como os comitês de farmácia, terapêuticos e controle de infecção hospitalar. As recomendações nas tabelas 1 e 1A para cada grupo de organismos incluem agentes de eficácia comprovada, com desempenho aceitável em testes *in vitro*. Na seleção dos agentes para grupos específicos de testes/relatórios, deve-se considerar a eficácia clínica, a prevalência de resistência, a minimização do surgimento de resistência, custo, indicações da FDA e as atuais recomendações consensuais para drogas de primeira escolha e drogas alternativas, além das questões específicas descritas. Os testes dos agentes selecionados podem ser úteis para fins de controle das infecções.

#### 3.1 Relatórios Rotineiros

Os agentes relacionados nas tabelas 1 e 1A são considerados apropriados e recomendados para testes e relatórios no presente momento. Para evitar interpretações indevidas, os relatórios rotineiros enviados aos médicos devem incluir apenas as drogas apropriadas para uso terapêutico, conforme sugerido nas tabelas 1 e 1A. Pode-se acrescentar ou excluir agentes dessas listas básicas, conforme as circunstâncias. Outras drogas, além das apropriadas para uso terapêutico, também podem ser testadas para se obter dados taxonômicos e informações epidemiológicas, embora essas informações não devam ser incluídas nos relatórios de patologia clínica. Entretanto, esses resultados devem estar disponíveis (no laboratório) para o especialista em controle de infecção e/ou o epidemiologista hospitalar.

#### 3.2 Nomes Não-comerciais

Para minimizar a confusão, deve-se usar o nome não-comercial (ex., genérico) oficial dos agentes antimicrobianos nos relatórios. Para enfatizar as relações entre as muitas drogas atualmente disponíveis, estas podem ser agrupadas por classe de droga, da seguinte maneira.

##### 3.2.1 $\beta$ -Lactâmicos

Os agentes antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos compartilham o anel central de  $\beta$ -lactâmico que possui quatro elementos, sendo seu principal modo de ação a inibição da síntese da parede celular. Estruturas anelares adicionais ou grupos substituintes acrescentados ao anel  $\beta$ -lactâmico determinam se o agente é penicilina, cefem, carbapenem, ou monobactam.

###### 3.2.1.1 Penicilinas

O espectro de atividade da penicilina inclui principalmente bactérias gram-negativas, que não produzem  $\beta$ -lactamase, algumas das quais são fastidiosas. As aminopenicilinas (ampicilina e amoxicilina) são ativas contra outras espécies de gram-negativos, incluindo alguns membros das Enterobacteriaceae. As carboxipenicilinas (carbenicilina e ticarcilina) e ureidopenicilinas (mezlocilina e piperacilina) possuem um espectro contra gram-negativos consideravelmente ampliado, incluindo atividade contra muitas *Pseudomonas* e *Burkholderia* spp. As penicilinas estáveis na presença de penicilinas e (cloxacilina, dicloxacilina, metecilina, nafcillin e oxacilina) possuem um espectro predominantemente contra gram-positivo, que inclui os estafilococos produtores de penicilinase.

###### 3.2.1.2 Combinações $\beta$ -Lactâmico / Inibidor da $\beta$ -Lactamase

Essas combinações de antimicrobianos incluem uma penicilina e um segundo agente que possui atividade antibacteriana mínima, mas funciona como inibidor de algumas  $\beta$ -lactamases. Atualmente, são usados três inibidores de  $\beta$ -lactamase: ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. Os resultados de testes empregando apenas a parte de penicilina da combinação contra organismos produtores de  $\beta$ -lactamase não predizem,

com frequência, a sensibilidade à combinação das duas drogas.

### 3.2.1.3 Cefens (incluindo as cefalosporinas)

Os cefens são agentes antimicrobianos que possuem um espectro de atividade ligeiramente diferente contra as bactérias gram-positivas e gram-negativas. Essa classe antimicrobiana, os cefens, inclui as cefalosporinas clássicas, assim como os agentes nas subclasses cefamicina, oxacefem e carbacefens (ver Glossário I). Com frequência, as diferentes cefalosporinas são chamadas de cefalosporinas de “primeira”, “segunda”, “terceira”, ou “quarta geração”, com base na abrangência de sua atividade contra as bactérias gram-negativas mais resistentes aos antibióticos. Nem todos os representantes de um determinado grupo ou geração possuem necessariamente o mesmo espectro de atividade. Devido às diferenças na atividade, pode-se selecionar representantes de cada grupo para testes rotineiros.

### 3.2.1.4 Carbapenens

A estrutura dos carbapenens difere pouco da estrutura das penicilinas. Além disso, são muito mais resistentes à hidrólise por  $\beta$ -lactamase, o que lhes confere atividade de amplo espectro contra numerosas bactérias gram-positivas e gram-negativas.

### 3.2.1.5 Monobactams

Os agentes antimicrobianos denominados monobactams são  $\beta$ -lactâmicos monocíclicos. Atualmente, o aztreonam (ativo contra as bactérias gram-negativas aeróbicas) é o único antibiótico monobactâmico liberado para uso pelo US FDA.

## 3.2.2 Glicopeptídeos

Os agentes antimicrobianos glicopeptídeos possuem uma estrutura química complexa comum, e seu principal modo de ação é a inibição da síntese da parede celular num sítio diferente do dos  $\beta$ -lactâmicos. A atividade desse grupo é dirigida principalmente contra as bactérias gram-positivas. A vancomicina é o agente indicado para o tratamento de infecções bacterianas gram-positivas nos pacientes alérgicos à penicilina, sendo útil na terapia de infecções causadas por cepas bacterianas gram-positivas resistentes aos agentes  $\beta$ -lactâmicos, ex., *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e alguns enterococos.

## 3.2.3 Aminoglicosídeos

Os membros desse grupo de agentes antimicrobianos estruturalmente relacionados inibem a síntese protéica bacteriana em nível ribossômico. A classe inclui membros que são afetados, de diferentes formas, pelas enzimas inativadoras dos aminoglicosídeos, o que resulta em algumas diferenças de espectro entre os diversos agentes. Os aminoglicosídeos são usados, primordialmente, para tratar infecções causadas por bacilos gram-negativas aeróbicas ou em combinações sinérgicas com agentes antimicrobianos ativos na parede celular (ex., penicilina, ampicilina e vancomicina) contra algumas bactérias gram-positivas resistentes, como os enterococos.

## 3.2.4 Macrolídeos

Os macrolídeos são agentes antimicrobianos estruturalmente relacionados que inibem a síntese protéica em nível ribossômico. Vários membros dessa classe em uso atualmente deveriam ser considerados para testes contra isolados de bactérias gram-positivas ou gram-negativas fastidiosas. As drogas que compõem o grupo dos macrolídeos estão estreitamente inter-relacionadas e, com poucas exceções, apenas a eritromicina precisa ser testada de forma rotineira.

## 3.2.5 Tetraciclina

As tetraciclina inibem a síntese protéica em nível ribossômico em certas bactérias gram-negativas e gram-positivas. As drogas desse grupo estão estreitamente inter-relacionadas e, com poucas exceções, apenas a tetraciclina precisa ser testada de forma rotineira. Os organismos suscetíveis à tetraciclina são considerados sensíveis também a doxiciclina e minociclina. Entretanto, alguns organismos intermediários ou resistentes à tetraciclina podem ser suscetíveis a doxiciclina ou minociclina, ou a ambas.

### 3.2.6 Quinolonas

Esse grupo inclui vários agentes estreitamente interligados que funcionam, principalmente, por meio da inibição da atividade da DNA-girase de muitas bactérias gram-negativas e gram-positivas. Algumas diferenças de espectro podem exigir testes separados dos diferentes agentes.

### 3.2.7 Inibidores da Via Metabólica do Folato

Esse grupo abrange vários agentes quimioterápicos com espectros de atividade similares que resultam na inibição da via metabólica do folato nas bactérias. O sulfisoxazol é uma das sulfonamidas mais frequentemente usadas nas infecções do trato urinário; sendo, assim, uma escolha apropriada para testes *in vitro*. Em geral, a sulfametoxazol é testada em combinação com o trimetoprim, que inibe a via metabólica do folato de algumas bactérias gram-negativas e gram-positivas em uma etapa subsequencial.

### 3.2.8 Classes de Droga única

Essas classes representam agentes antimicrobianos para os quais não há produtos relacionados que sejam apropriados para testes *in vitro*. Incluem cloranfenicol, clindamicina, linezolida e quinupristina-dalfopristina, que inibem a síntese protéica, bem como a rifampina, que inibe a síntese do RNA. A nitrofurantoina, usada apenas no tratamento das infecções do trato urinário, inibe a síntese de várias proteínas em nível ribossômico. A fosfomicina, também aprovada pelo FDA para infecções do trato urinário, inibe as enzimas que participam na síntese da parede celular.

## 3.3 Diretrizes de Seleção

Para tornar os testes rotineiros de sensibilidade relevantes e práticos, o número de agentes testados deve ser limitado. As tabelas 1 e 1A relacionam as drogas que deveriam preencher os requisitos básicos de uso rotineiro na maioria dos laboratórios de patologia clínica. As tabelas estão divididas em colunas baseadas em organismos específicos ou grupos de organismos, indicando-se, a seguir, as diversas drogas em ordem prioritária de teste, no intuito de auxiliar os laboratórios na seleção de suas baterias de testes rotineiros. As ‘caixas’ na tabela designam grupos de agentes comparáveis, para os quais, em geral, não é necessário duplicar os testes, uma vez que os resultados interpretativos são normalmente similares e a eficácia clínica, semelhante. Além disso, a palavra “ou” designa um grupo de agentes afins, que mostram espectro de atividade e resultados interpretativos praticamente idênticos e para os quais a resistência e sensibilidade cruzadas são quase completas.

Assim, em geral, apenas um agente em cada ‘caixa’ de seleção (agrupamento ou grupo afim) precisa ser testado. Com poucas exceções, o agente no relatório deve ser testado, exceto nos casos em que um relatório do teste de um outro agente fornece um resultado mais preciso (ex., sensibilidade dos estafilococos a cefens com base em teste de oxacilina). Deve-se testar os agentes que constam do formulário do hospital ou, então, o relatório deve incluir notas de rodapé indicando que outros agentes não testados podem ter atividade comparável.

## 3.4 Diretrizes Sugeridas para Testes e Relatórios Seletivos e Rotineiros

Conforme relacionado nas tabelas 1 e 1A, os agentes no Grupo A são considerados apropriados para inclusão num painel de testes primários de rotina, assim como para os relatórios rotineiros dos resultados de grupos específicos de organismos.

O Grupo B inclui agentes clinicamente importantes, especialmente nas infecções nosocomiais, os quais podem merecer testes primários. Entretanto, esses agentes podem ser reportados apenas seletivamente, como quando o organismo é resistente a agentes da mesma classe, como no Grupo A. A liberação dos resultados também é indicada em outros casos, incluindo fontes selecionadas de espécimes (ex., uma cefalosporina de terceira geração contra bacilos entéricos de líquido céfalo-raquidiano [LCR] ou sulfametoxazol/trimetoprim contra isolados do trato urinário); infecções polimicrobianas; infecções que afetam diversos sítios corpóreos; mediante solicitação, em casos de alergia, intolerância, ou falta de resposta a um agente do Grupo A; ou o fornecimento de informações ao pessoal de controle de infecção, como ferramenta epidemiológica.

O Grupo C inclui agentes antimicrobianos alternativos ou suplementares que devem ser testados em instituições afetadas por cepas endêmicas ou epidêmicas resistentes a várias drogas primárias (especialmente na mesma classe, por exemplo,  $\beta$ -lactâmicos ou aminoglicosídeos); para tratamento de pacientes alérgicos às drogas primárias; para tratamento de organismos pouco comuns (e.x., cloranfenicol para isolados extra-intestinais de *Salmonella* spp. ou enterococos resistentes à vancomicina); ou para fornecer informações ao pessoal de controle de infecção, como ferramenta epidemiológica.

O Grupo U relaciona certos agentes antimicrobianos (ex., nitrofurantoína e algumas quinolonas) que são usadas, somente ou principalmente, no tratamento de infecções do trato urinário; não é necessário emitir relatórios rotineiros sobre a ação desses agentes em patógenos recuperados de outros sítios de infecção. Outros agentes com indicações mais amplas podem ser incluídos no Grupo U contra patógenos específicos do trato urinário (ex., *P. aeruginosa*).

O Grupo O (“outros”) inclui agentes que possuem indicação clínica para o grupo de organismos, mas, em geral, não são candidatos para testes e relatórios rotineiros nos Estados Unidos.

O Grupo Inv. (“investigação”) inclui agentes que estão sendo pesquisados para o grupo de organismos, mas ainda não foram aprovados pelo FDA.

Cada laboratório deve decidir quais dos agentes relacionados na tabela 1 e tabela 1A devem ser reportados rotineiramente (Grupo A) e para quais se deve preparar relatórios seletivos (do Grupo B), em consulta com os especialistas em doenças infecciosas e o farmacêutico, assim como os comitês de farmácia, terapêuticos e controle de infecção hospitalar. Os relatórios seletivos podem ajudar a melhorar a relevância clínica dos relatórios de resultados e a minimizar a seleção de cepas nosocomiais multirresistentes resultantes do uso excessivo de agentes antimicrobianos de amplo espectro. No caso dos agentes do Grupo B, os resultados que não são liberados rotineiramente devem ser disponibilizados mediante solicitação, ou podem ser liberados para espécimes selecionados. Resistência inesperada, quando confirmada, deve ser relatada, por exemplo, resistência a um agente secundário, mas sensibilidade a um agente primário.

## **4. Reagentes para o Teste de Difusão em Disco**

### **4.1 Meio de Ágar Müller-Hinton**

Dentre os muitos meios disponíveis, o subcomitê considera o ágar Müller-Hinton o melhor para testes rotineiros de sensibilidade contra bactérias não fastidiosas, pelas seguintes razões.

- Demonstra reprodutibilidade aceitável entre os diferentes lotes nos testes de sensibilidade.
- Contém baixo teor de inibidores de sulfonamida, trimetoprim e tetraciclina.
- Permite crescimento satisfatório dos patógenos não fastidiosas.
- Existe um grande acervo de dados e experiência relativos a testes de sensibilidade realizados com esse meio.

Embora o ágar Müller-Hinton seja geralmente confiável para os testes de sensibilidade, os resultados obtidos com alguns lotes podem, ocasionalmente, variar de maneira significativa. Se um lote do meio não promove crescimento adequado de um organismo a ser testado, os halos de inibição obtidos por disco-difusão serão, em geral, maiores que os esperados e podem exceder os limites aceitáveis de controle de qualidade. Só as formulações do meio Müller-Hinton que tenham sido testadas de acordo com o documento M6—*Protocols for Evaluating Dehydrated Mueller-Hinton Agar* do NCCLS e que atendam aos limites de aceitação descritos nesse documento devem ser utilizadas.

#### 4.1.1 Preparação do Ágar Müller-Hinton

O preparo do ágar Müller-Hinton compreende as seguintes etapas:

- (1) O ágar Müller-Hinton deve ser preparado a partir de uma base desidratada disponível comercialmente e conforme as instruções do fabricante.
- (2) Imediatamente após passar pela autoclave, deixar resfriar em banho-maria entre 45 e 50°C.
- (3) Despejar o meio recém preparado e resfriado em placas de petri de fundo chato, em vidro ou plástico, numa superfície horizontal, para garantir uma profundidade uniforme de aproximadamente 4 mm. Isso corresponde a 60-70 mL de meio para placas com 150 mm de diâmetro e 25-30 mL, para placas com diâmetro de 100 mm.
- (4) O meio ágar deve esfriar a temperatura ambiente e ser armazenado em geladeira (de 2 a 8°C), exceto quando a placa for usada no mesmo dia,
- (5) As placas devem ser usadas até sete dias após a preparação, a não ser que sejam tomadas precauções adequadas, como embrulhá-las em plástico, para minimizar o ressecamento do ágar.
- (6) Deve-se examinar uma amostra representativa de cada lote de placas para confirmar sua esterilidade, mediante a sua incubação a 30-35° C, durante 24 horas ou mais.

#### 4.1.2 pH

O pH de cada lote de ágar Müller-Hinton deve ser verificado quando o meio é preparado. O método exato a ser usado dependerá, em grande parte, do tipo de equipamento disponível no laboratório. O meio ágar deve ter pH entre 7,2 e 7,4 a temperatura ambiente após solidificação. Se o pH for demasiado baixo, algumas drogas parecerão ter perdido sua potência (ex., aminoglicosídeos, quinolonas e macrolídeos), enquanto que outros agentes poderão parecer excessivamente ativos (ex., tetraciclina). Se o pH for demasiado alto, efeitos opostos podem ser esperados. O pH pode ser verificado das seguintes maneiras.

- Macerar uma quantidade suficiente de ágar para submergir a ponta de um eletrodo do pHmetro.
- Permitir que uma pequena quantidade de ágar solidifique em torno da ponta de um eletrodo do pHmetro, num bquer ou xícara.
- Usar um eletrodo de superfície devidamente calibrado.

#### 4.1.3 Umidade

Se, logo antes de usar, o meio apresentar excesso de umidade na superfície, as placas devem ser colocadas em uma incubadora (35° C) ou capela de fluxo laminar a temperatura ambiente, com as tampas entreabertas, até que o excesso de umidade superficial evapore (em geral, de 10 a 30 minutos). A superfície deverá estar úmida, mas não deverá haver gotículas de água na superfície do meio ou na tampa da placa de petri quando as placas forem inoculadas.

#### 4.1.4 Efeitos da Timidina ou Timina

Os meios contendo teores excessivos de timidina ou timina podem reverter o efeito inibitório das sulfonamidas e do trimetoprim, produzindo, assim, halos de inibição menores e menos nítidos, ou mesmo nenhum halo de inibição, o que pode resultar em relatório de falsa-resistência. Deve-se usar ágar Müeller-Hinton com o menor teor possível de timidina. Se surgirem problemas de controle de qualidade com as sulfonamidas e o trimetoprim, poderá ser necessário verificar o ágar Müeller-Hinton. Novos lotes de ágar Müeller-Hinton, podem ser testados para *Enterococcus faecalis* ATCC<sup>®</sup> 29212 ou, alternativamente, *Enterococcus faecalis* ATCC<sup>®</sup> 33186, com discos de sulfametoxazol/trimetoprim. Um meio satisfatório fornecerá halos de inibição claros e nítidos, com diâmetro de 20mm ou mais. Um meio insatisfatório não produzirá qualquer halo de inibição, crescimento dentro do halo, ou um halo com menos de 20mm de diâmetro.

#### 4.1.5 Efeitos de Variação nos Cátions Divalentes

As variações nos cátions divalentes, principalmente magnésio e cálcio, afetarão os resultados dos testes dos aminoglicosídeos e da tetraciclina contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa*; a variação nos níveis de cálcio também afeta os resultados dos testes de daptomicina. Um teor excessivo de cátions reduzirá os tamanhos dos halos de inibição, enquanto que um baixo teor de cátions pode resultar em halos de inibição inadmissivelmente grandes. O excesso de íons de zinco pode reduzir os tamanhos dos halos de inibição dos carbapenems. Os testes de desempenho com cada lote de ágar Müeller-Hinton devem estar em conformidade com os limites de controle relacionados na tabela 3.

#### 4.1.6 Testes de Cepas com Crescimento Insatisfatório

Apenas as bactérias aeróbicas ou facultativas que crescem bem em ágar Müeller-Hinton sem suplementação devem ser testadas nesse meio. Certas espécies exigentes de *Haemophilus* spp., *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae* e dos estreptococos β-hemolíticos e viridans não crescem suficientemente em ágar Müeller-Hinton sem suplementação. Esses organismos requerem suplementação ou meios diferentes para crescer, e devem ser testados nos meios descritos na Seção 6.

### 4.2 Armazenamento de Discos Antimicrobianos

Os frascos contendo discos de papel especificamente preparados para os testes de sensibilidade disponíveis comercialmente, são, em geral, empacotados para assegurar condições anidras apropriadas. Os discos devem ser armazenados conforme indicado a seguir.

- Refrigerar os recipientes a temperatura de 8°C ou menos, ou congelar a -14°C ou menos, num congelador comum (não do tipo “frost-free”) até o momento de usar. Os pacotes fechados de discos contendo drogas da classe de β-lactâmicos devem ser armazenados congelados, com exceção de um pequeno número de discos reservados para o trabalho cotidiano, que pode ser refrigerado durante, no máximo, uma semana. Alguns agentes lábeis (ex., combinações de ácido clavulânico, imipenem e cefaclor) podem manter maior estabilidade quando armazenados congelados até o dia em que forem usados.
- Os recipientes fechados de discos devem ser retirados da geladeira ou congelador uma ou duas horas antes de serem usados, para que se equilibrem em temperatura ambiente antes de serem abertos. Esse procedimento minimiza a condensação quando o ar quente entra em contato com os discos frios.
- Após retirar o cartucho de discos do pacote selado, colocá-lo num dissecador bem selado. Quando se usa um dispensador de discos, este deve ser tampado hermeticamente, acrescentando-se um dissecante adequado. Deve-se deixar que a temperatura do dispensador chegue à temperatura ambiente antes de abri-lo. Evitar umidade excessiva, substituindo o dissecante sempre que o indicador mudar de cor.

<sup>b</sup> ATCC<sup>®</sup> é marca registrada da American Type Culture Collection.  
Uma Norma Global Consensual do NCCLS. © NCCLS. Todos os direitos estão reservados.

- Quando não estiver em uso, o dispensador de discos deve ser mantido refrigerado.
- Apenas os discos dentro do prazo de validade do fabricante podem ser usados. Os discos devem ser descartados no vencimento.

### 4.3 Controle de Turbidez para a Preparação do Inóculo

Para padronizar a densidade do inóculo para um teste de sensibilidade, deve-se usar um controle de turbidez de BaSO<sub>4</sub>, equivalente a uma solução padrão de McFarland 0,5 ou seu equivalente óptico (ex., suspensão de partículas de látex). A solução padrão de McFarland 0,5 de BaSO<sub>4</sub> pode ser preparada da seguinte maneira.

- (1) Acrescenta-se uma alíquota de 0,5 mL de BaCl<sub>2</sub> 0.048 mol/L (1,175% w/v BaCl<sub>2</sub> • 2H<sub>2</sub>O) a 99,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,18 mol/L (1% v/v), homogeneizando constantemente para manter a suspensão.
- (2) A densidade correta do controle de turbidez deve ser verificada usando um espectrofotômetro com fonte de luz de 1-cm e cubeta apropriada para determinar a absorvância. A absorvância da solução padrão de McFarland a 0,5 deverá variar de 0,08 a 0,10 utilizando um comprimento de onda de 625 nm.
- (3) A suspensão de sulfato de bário deve ser transferida, em alíquotas de 4 a 6 mL, para tubos com tampas de rosca do mesmo tamanho usados para cultivar e diluir o inóculo bacteriano.
- (4) Esses tubos devem ser selados hermeticamente e armazenados em local escuro, à temperatura ambiente.
- (5) O controle de turbidez de sulfato de bário deve ser agitado vigorosamente num misturador mecânico tipo vórtex antes de cada uso, verificando se está uniformemente turbido. No caso de partículas maiores, o controle deve ser substituído. As suspensões de partículas de látex devem ser misturadas invertendo-as suavemente, e não num misturador tipo vórtex.
- (6) Os controles de sulfato de bário devem ser substituídos, ou suas densidades verificadas, todo mês.

## 5. Execução de Testes de Disco-Difusão

### 5.1 Preparação do Inóculo

#### 5.1.1 Método do Crescimento

O método do crescimento é realizado da seguinte maneira:

- (1) Pelo menos de três a cinco colônias, bem isoladas, do mesmo tipo morfológico são selecionadas da placa de ágar. A superfície de cada colônia é tocada com uma alça, e os microorganismos são transferidos para um tubo contendo 4-5mL de um meio de cultura adequado, como caldo de soja tríptica.
- (2) Incuba-se a cultura em caldo, a 35° C, até alcançar ou exceder a turbidez de uma solução padrão de McFarland 0,5 (em geral, de duas a seis horas).
- (3) Ajusta-se a turbidez da cultura em crescimento com solução salina estéril ou caldo, de modo a obter uma turbidez óptica comparável à da solução padrão de McFarland a 0,5. Isso resulta numa suspensão contendo aproximadamente de 1 a 2 x 10<sup>8</sup> UFC/mL de *E. coli* ATCC® 25922. Para realizar esta etapa corretamente, usa-se um espectrofotômetro ou, quando executado a olho nú, luz suficiente para comparar o inóculo do tubo ao da solução padrão de McFarland a 0,5 utilizando um cartão de fundo branco com linhas contrastantes pretas ao fundo.

### 5.1.2 Método de Suspensão Direta das Colônias

- (1) Como alternativa conveniente para o método de crescimento, pode-se preparar o inóculo fazendo uma suspensão direta, em caldo ou solução salina, de colônias isoladas selecionadas numa placa de ágar de 18-24 horas (deve-se usar um meio não seletivo, como ágar sangue). A suspensão é ajustada para que sua turbidez coincida com a da solução padrão de McFarland 0,5, conforme delineado na Seção 5.1.1.
- (2) É o método recomendado para testar os organismos fastidiosos como *Haemophilus* spp. e *Neisseria gonorrhoeae*, bem como os estreptococos (ver Seção 6) e para testar possível resistência dos estafilococos à meticilina ou à oxacilina.

### 5.2 Inoculação das Placas de Teste

- (1) Em condições ideais, mergulha-se um swab de algodão estéril na suspensão ajustada, até 15 minutos após ajustar a turbidez da suspensão de inóculo. O swab deve ser girado várias vezes e apertado firmemente contra a parede interna do tubo, acima do nível do líquido. Isso ajudará a retirar qualquer excesso de inóculo no swab.
- (2) A superfície seca da placa de ágar Müller-Hinton é inoculada esfregando o swab em toda a superfície estéril do ágar. Repete-se o procedimento esfregando outras duas vezes, girando a placa aproximadamente 60° cada vez, a fim de assegurar a distribuição uniforme do inóculo. Como passo final, passa-se um swab na margem da placa de ágar.
- (3) A tampa pode ser deixada entreaberta de três a cinco minutos, embora nunca mais de 15 minutos, de maneira a permitir que qualquer excesso de umidade seja absorvido antes de se aplicar os discos impregnados de droga.

**OBSERVAÇÃO:** Deve-se evitar densidades extremas de inóculo. Nunca use culturas em caldo, não-diluídas, do dia anterior, ou outros inóculos não padronizados para semear as placas.

### 5.3 Aplicação de Discos a Placas de Ágar Inoculadas

- (1) Um conjunto predeterminado de discos antimicrobianos é colocado na superfície de uma placa de ágar semeada. Cada disco deve ser pressionado de encontro à placa, de maneira a assegurar contato completo com a superfície de ágar. Independentemente de serem aplicados individualmente ou com dispensador, os discos devem ser distribuídos por igual, de maneira que a distância de centro para centro não exceda 24mm. Em geral, deve-se colocar 12 discos, no máximo, numa placa de 150mm, ou cinco discos numa placa de 100mm. Uma vez que algumas drogas se difundem quase instantaneamente, o disco não deve ser reaplicado após ter entrado em contato com a superfície de ágar. Em vez disso, coloque um novo disco em outra parte da placa.
- (2) As placas devem ser invertidas e colocadas numa estufa, a 35° C, até 15 minutos após a aplicação dos discos. Com exceção de *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae* e dos estreptococos (ver Seção 6), as placas não devem ser incubadas em atmosfera enriquecida com CO<sub>2</sub>, porque os padrões de interpretação foram desenvolvidos usando incubação em ar ambiente, e o CO<sub>2</sub> irá alterar significativamente o tamanho dos halos de inibição de alguns agentes.

### 5.4 Leitura das Placas e Interpretação dos Resultados

- (1) Após 16-18 horas de incubação, examina-se cada placa. Se a placa foi satisfatoriamente semeada, e o inóculo era correto, os halos de inibição resultantes serão uniformemente circulares e haverá um tapete confluyente de crescimento. Se colônias individuais forem aparentes, o inóculo era demasiado leve e o teste deverá ser repetido. Os diâmetros dos halos de inibição total (julgadas a olho nu) são mensurados, incluindo o diâmetro do disco.

Os halos são medidas em milímetros usando um paquímetro ou uma régua, que é encostado na parte de trás da placa de petri invertida. Segurar a placa de petri poucas polegadas acima de um fundo não refletor, iluminando-a com luz refletida. Se tiver sido acrescentado sangue à base de ágar (como ocorre com os estreptococos), os halos deverão ser medidos a partir da superfície superior do ágar iluminada com luz refletida, uma vez retirada a tampa. Se oxacilina estiver sendo testada contra *Staphylococcus* spp., ou vancomicina contra *Enterococcus* spp., serão necessárias 24 horas de incubação antes de se poder considerar o microorganismo sensível; outros agentes podem ser lidos, e os resultados liberados, em 16-18 horas (ver Seção 7.1.2). Emprega-se luz transmitida (colocando a placa na contraluz) para verificar se há crescimento discreto de colônias resistentes à metilina ou à vancomicina, nos halos de inibição de oxacilina e vancomicina, respectivamente. Qualquer crescimento discernível dentro do halo de inibição é indicativo de resistência à metilina ou à vancomicina.

- (2) O halo de inibição será considerado a área sem crescimento detectável a olho nu. O crescimento de pequenas colônias, detectável apenas com lente de aumento, na margem do halo de inibição do crescimento deve ser ignorado. Entretanto, no caso de crescimento discreto de colônias dentro de um halo de inibição evidente, o teste deverá ser repetido com uma cultura ou subcultura pura de uma única colônia, isolada da placa de cultura primária. Se pequenas colônias continuarem a crescer no halo de inibição, o halo de inibição livre de colônias deve ser medido. Algumas vezes, as cepas de *Proteus* spp. podem se espalhar para as áreas do halo de inibição de certos agentes antimicrobianos. Com *Proteus* spp., o tênue véu de crescimento, dentro de um halo de inibição evidente deve ser ignorado. Quando se usa um meio suplementado com sangue para testar estreptococos, o halo de inibição do crescimento deve ser medido, ao invés da zona de hemólise. Com o trimetoprim e as sulfonamidas, os antagonistas no meio podem permitir um crescimento discreto; portanto, não considere qualquer crescimento discreto (20% ou menos da zona de crescimento) e meça a margem mais aparente para determinar o diâmetro do halo de inibição.
- (3) Interprete os tamanhos dos halos de inibição se reportando às tabelas 2A até 2I, classificando os organismos, nos relatórios, como sensíveis, intermediários, ou resistentes aos agentes testados (ver Seção 9). Alguns agentes só podem ser registrados como sensíveis, visto que apenas os pontos de corte de sensibilidade são fornecidos.

## 6. Organismos Fastidiosos

O meio Müeller-Hinton descrito anteriormente para os patógenos aeróbicos de crescimento rápido não é adequado para os organismos fastidiosos. Quando for necessário realizar testes de disco-difusão dos organismos fastidiosos, o meio, os procedimentos de controle de qualidade e os critérios de interpretação devem ser adequados a cada organismo. A precisão dos testes de disco-difusão para *Haemophilus influenzae*, *N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae*, estreptococos β-hemolíticos e do grupo de viridans tem sido demonstrada para agentes selecionados, e esses testes são descritos no presente documento. Outras bactérias fastidiosas podem ser testadas usando o método de diluição descrito no documento M7—*Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically* do NCCLS. Os organismos anaeróbicos não devem ser testados usando o teste de disco-difusão. Consulte o documento document M11— *Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria* do NCCLS para os procedimentos a serem utilizados para os testes de sensibilidade apropriados para organismos anaeróbicos.

### 6.1 Espécies de *Haemophilus*

#### 6.1.1 Meio Ágar

O meio preferencial nos testes de disco-difusão de *Haemophilus* spp. é o meio de teste de *Haemophilus*, denominado HTM, em inglês.<sup>5</sup> Não se recomenda o ágar chocolate Müeller-Hinton para testes rotineiros de *Haemophilus* spp.

Em ágar, o meio de teste de *Haemophilus* é composto pelos seguintes ingredientes.

- ágar Müller-Hinton (MHA);
- 15 µg/mL de β-NAD;
- 15 µg/mL de hematina bovina; e
- 5 g/L de extrato de levedura.

Para fazer o HTM, prepara-se primeiramente uma solução básica fresca de hematina, dissolvendo-se 50 mg de hematina bovina em pó em 100 mL de NaOH a 0,01 mol/L, aquecendo e mexendo até que o pó esteja completamente dissolvido. Acrescenta-se 30 mL da solução básica de hematina a 1 L de MHA com 5g de extrato de levedura. Após autoclavar o meio resfria-lo a 45-50° C, acrescentar, assepticamente, 3 mL de uma solução básica de NAD (50 mg de NAD dissolvidos em 10 mL de água destilada e esterilizada por filtração). O pH deve variar de 7,2 a 7,4.

A cepa de *Haemophilus influenzae* (ATCC®10211) é utilizada como uma cepa de controle de qualidade para verificar as propriedades de crescimento do HTM. Em especial, os fabricantes de HTM são incentivados a usar *Haemophilus influenzae* ATCC® 10211 como cepa para os testes de controle de qualidade.

### 6.1.2 Metodologia

- (1) Deve-se usar o procedimento de suspensão direta das colônias nos testes para *Haemophilus* spp. Usando colônias obtidas diretamente de uma placa de cultura em ágar chololate, incubada por uma noite (de preferência, 20-24 horas), prepara-se uma suspensão do organismo em caldo de Müller-Hinton ou solução salina a 0,9%. A suspensão deve ser ajustada para uma turbidez equivalente à de uma solução padrão de McFarland 0,5, usando um espectrofotômetro. Essa suspensão deverá conter aproximadamente de 1 a 4 x 10<sup>8</sup> UFC/mL. Deve-se preparar a suspensão com cuidado, porque concentrações mais altas de inóculo podem levar a resultados falso-negativos com agentes antimicrobianos β-lactâmicos, especialmente quando se testa cepas de *H. influenzae* produtoras de β-lactamase. A suspensão de inóculo deve ser aplicada à placa de inoculação até 15 minutos após ter sido ajustada sua turbidez.
- (2) O teste de disco deve ser executado conforme descrito, começando na Seção 5.2 para as bactérias não fastidiosas, exceto que, em geral, não devem ser aplicados mais que nove discos na superfície das placas de 150 mm, nem mais que quatro discos nas placas de 100 mm.
- (3) As placas são incubadas a 35° C, em atmosfera com CO<sub>2</sub> a 5%, durante 16 a 18 horas, antes de aferir os halos de inibição.
- (4) A margem do halo de inibição é a área que não mostra crescimento evidente, visível a olho nu. O crescimento discreto de pequenas colônias, que parecem dissipar-se a partir do halo mais evidente, deve ser ignorado nas mensurações.

### 6.1.3 Critérios de Interpretação do Diâmetro do Halo

Os agentes antimicrobianos sugeridos para os testes rotineiros de *Haemophilus* spp. constam da tabela 1A. Os critérios específicos de interpretação do diâmetro dos halos de inibição a serem usados nos testes contra *Haemophilus* spp. estão relacionados na tabela 2E. Não se recomenda realizar testes de disco-difusão para outros agentes antimicrobianos contra *Haemophilus* spp. .

## 6.2 *Neisseria gonorrhoeae*

### 6.2.1 Meio Ágar

O meio recomendado para testes com *N. gonorrhoeae* é o ágar GC, ao qual se acrescenta um suplemento de crescimento definido a 1% após autoclavar.<sup>6</sup> Não é necessário usar um suplemento de crescimento isento de

cisteína para os testes de disco-difusão. Não se recomenda usar ágar chocolate enriquecido para os testes de sensibilidade de *N. gonorrhoeae*.

### 6.2.2 Metodologia

- (1) O procedimento de suspensão direta das colônias deve ser usado para testar *N. gonorrhoeae*. Usando colônias tiradas diretamente de uma placa de cultura em ágar chocolate incubadas durante à noite, prepara-se uma suspensão equivalente à solução padrão de McFarland 0,5, seja em caldo de Mueller-Hinton ou em solução salina a 0,9%. Quinze minutos após ajustar sua turbidez, a suspensão de inóculo deve ser usada para semear as placas.
- (2) Deve-se seguir os passos do teste de disco difusão, conforme descritos na Seção 5.2 para as bactérias não fastidiosas. Até nove discos antimicrobianos devem ser aplicados à superfície das placas de 150mm, e quatro discos, no máximo, às placas de 100mm. Entretanto, serão necessários menos discos por placa para testar certos agentes (ex., quinolonas) que produzem maiores halos de inibição.
- (3) As placas são incubadas a 35° C, numa atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%, durante 20 a 24 horas, antes de medir os halos de inibição.

### 6.2.3 Critérios de Interpretação do Diâmetro do Halo

Os agentes antimicrobianos sugeridos para os testes rotineiros com *N. gonorrhoeae* constam na tabela 1A. Os critérios específicos de interpretação do diâmetro dos halos a serem usados nos testes contra *N. gonorrhoeae* estão relacionados na tabela 2F. Não se recomenda realizar testes de disco-difusão para outros agentes antimicrobianos contra *N. gonorrhoeae*.

**OBSERVAÇÃO:** Os organismos com diâmetros da zona de inibição  $\leq 19$  mm, para discos com 10 µg de penicilina, em geral, são produtoras de  $\beta$ -lactamase.<sup>6</sup> Entretanto, os testes para  $\beta$ -lactamase (ver Seção 8) são mais rápidos e, portanto, preferíveis para a identificação dessa resistência mediada por plasmídeo. Os organismos com resistência à tetraciclina mediada por plasmídeo também têm halos de inibição (discos com 30-µg de tetraciclina)  $\leq 19$  mm. Os mecanismos cromossômicos da resistência a penicilina e tetraciclina produzem halos de inibição maiores, que podem ser identificados com exatidão usando os critérios de interpretação indicados na tabela 2F.

## 6.3 *Streptococcus pneumoniae* e Outros *Streptococcus* spp.

### 6.3.1 Meio Ágar

O meio recomendado para testes com *S. pneumoniae* e outros estreptococos é o ágar Mueller-Hinton suplementado por sangue de carneiro desfibrinado a 5%.

### 6.3.2 Metodologia

- (1) O procedimento de suspensão direta das colônias deve ser executado da seguinte maneira: as colônias de uma placa de ágar sangue de carneiro semeadas na véspera (de 16 a 18 horas) são suspensas em caldo Mueller-Hinton ou solução salina a 0,9% com uma densidade equivalente à turbidez da solução padrão de McFarland 0,5, conforme descrito na Seção 5.1.2. Quinze minutos após ajustada a turbidez da suspensão do inóculo, o mesmo deve ser usado para inoculação das placas.
- (2) Deve-se seguir os passos do teste em disco, conforme descritos na Seção 5.2 para as bactérias não fastidiosas. Até nove discos devem ser aplicados à superfície das placas de 150mm, e quatro discos, no máximo, às placas de 100mm.
- (3) As placas são incubadas a 35° C, numa atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%, durante 20 a 24 horas, antes de medir os

halos de inibição.

### 6.3.3 Critérios de Interpretação do Diâmetro do Halo

Os agentes antimicrobianos sugeridos para os testes rotineiros com pneumococos e outros estreptococos constam na tabela 1A. Os critérios específicos de interpretação do diâmetro dos halos de inibição a serem usados nos testes contra *S. pneumoniae* e outros estreptococos estão relacionados nas tabelas 2G e 2H, respectivamente.

**OBSERVAÇÃO:** Os isolados de *S. pneumoniae* com diâmetros da zona de inibição com oxacilina de  $\geq 20$  mm são sensíveis (MIC  $\leq 0,06$   $\mu\text{g/mL}$ ) à penicilina. Uma vez que halos de inibição  $\leq 19$  mm no teste de triagem de disco com oxacilina ocorrem com cepas resistentes à penicilina, cepas com sensibilidade intermediária e algumas cepas sensíveis, é necessário determinar a CIM para penicilina, meropenem e cefotaxime ou ceftriaxone, em isolados de *S. pneumoniae* com halos de inibição de oxacilina de  $\leq 19$  mm.<sup>7</sup> Os isolados não devem ser relatados como resistentes a penicilina ou de sensibilidade intermediária, com base, apenas, na zona de oxacilina de  $\leq 19$  mm.

Não se recomenda realizar testes de disco de oxacilina para determinar a sensibilidade à penicilina de outros estreptococos, que não o *S. pneumoniae*. Um disco de penicilina ou ampicilina pode ser usado para prever a sensibilidade apenas dos estreptococos  $\beta$ -hemolíticos. Deve-se determinar a CIM para penicilina de isolados de estreptococos do grupo viridans provenientes de sítios corpóreos normalmente estéreis (ex., líquido céfalo-raquidiano, sangue, osso, etc.). Os testes de disco-difusão com penicilina (e oxacilina) não são confiáveis para os estreptococos do grupo viridans.

## 7. Organismos-Problema

### 7.1 Estafilococos

#### 7.1.1 Resistência à Meticilina/Oxacilina

Historicamente, a resistência às penicilinas anti-estafilococos estáveis à hidrólise causada pelas  $\beta$ -lactamases tem sido chamada de “resistência à meticilina,” daí a sigla MRSA (de ‘*S. aureus* resistente à meticilina’, em inglês) ou MRS (de ‘estafilococos resistentes à meticilina’, em inglês), denominações ainda usadas com frequência embora a meticilina não seja mais o agente de escolha para teste e tratamento. No presente documento, vários termos são usados para fazer referência à resistência a esses agentes, por exemplo, “MRS,” “resistência à meticilina” ou “resistência à oxacilina”.

Alguns laboratórios continuam a ter problemas associados com a detecção do MRS. Para identificar melhor essas cepas, consideram-se os seguintes pontos.

- É mais provável que os testes com discos de oxacilina detectem resistência que os discos com meticilina ou nafcilina. Portanto, deve-se usar um disco com 1  $\mu\text{g}$  de oxacilina para testar resistência à meticilina/oxacilina.
- O inóculo deve ser preparado usando o método de suspensão direta das colônias (Seção 5.1.2), ao invés do método de crescimento do inóculo (Seção 5.1.1).
- Os testes para detectar a MRS devem ser incubados durante um período de 24 horas (ao invés de 16 a 18 horas), a 33-35° C (sem exceder os 35° C), antes de relatar sensibilidade. A resistência pode ser relatada quando se observar crescimento após o mínimo de 16 horas de incubação.
- Todo o halo de inibição ao redor do disco de oxacilina deve ser inspecionado cuidadosamente usando luz transmitida para identificar presença de pequenas colônias ou de um crescimento discreto dentro do halo de inibição.

- Os microbiologistas devem observar que os estafilococos resistentes à meticilina também apresentam, com frequência, resistência múltipla a várias classes de agentes antimicrobianos, incluindo aminoglicosídeos, clindamicina, macrolídeos, fenicóis, quinolonas, sulfonamidas e tetraciclina. A constatação de resistência múltipla indica a possibilidade de resistência à meticilina. Entretanto, cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina, que não mostram resistência a outras classes de agentes antimicrobianos, têm sido isoladas em populações de pacientes internados e ambulatoriais.
- Se o resultado do teste de disco-difusão for duvidoso para um possível isolado de *S. aureus* resistente à meticilina, é indispensável realizar testes confirmatórios adicionais, como o teste de triagem em ágar com sal de oxacilina-NaCl, descrito no documento M7—*Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically* do NCCLS.
- Os relatórios sobre o *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) e os estafilococos coagulase-negativos resistentes à meticilina devem classificar esses microorganismos como resistentes a todos os cefens e outros agentes β-lactâmicos (como amoxicilina-clavulânico, ampicilina-sulbactam, ticarcilina-clavulânico, piperacilina-tazobactam e imipenem), independentemente dos resultados dos testes *in vitro* com esses agentes. Isso deve-se ao fato de que a maioria dos casos documentados de infecções resistentes à meticilina não tem respondido bem a terapia com agentes β-lactâmicos, além de não haver dados clínicos convincentes documentando a eficácia clínica desses agentes.
- Os isolados de estafilococos portadores do gene *mecA*, que produzem PBP2a, o produto do gene *mecA*, devem ser classificados como resistentes à oxacilina.

### 7.1.2 Sensibilidade Reduzida à Vancomicina e Resistência à Vancomicina

Cepas de estafilococos coagulase-negativos com resistência intermediária e CIMs resistentes à vancomicina e à teicoplanina têm sido descritas.<sup>8,9</sup> A primeira ocorrência de cepas de *S. aureus* com sensibilidade diminuída à vancomicina (MICs de 4 a 8 µg/mL) foi relatada no Japão em 1997<sup>10</sup>, seguida, pouco tempo depois, por relatos de cepas similares nos EUA e na França<sup>11</sup>. Desconhece-se o mecanismo exato de resistência que resulta nessas CIMs elevadas, embora provavelmente envolva alterações na parede celular e hiperexpressão das proteínas ligadoras de penicilina (PBPs, na sigla em inglês). Até esta data, essas cepas de *S. aureus* parecem ter se desenvolvido a partir de MRSA.

O procedimento de disco-difusão não diferencia as cepas com sensibilidade reduzida à vancomicina (MICs de 4 a 8 µg/mL) das cepas sensíveis (CIM na faixa de 0,5 a 2 µg/mL), mesmo após incubação por 24 horas<sup>12</sup>. Para reconhecer as cepas com CIM de 4 a 8 µg/mL para vancomicina, é necessário realizar determinações da CIM. O teste de triagem em ágar para vancomicina, descrito para os enterococos, pode ser usado, com êxito, para detectar esses isolados<sup>12</sup>, incubando as placas durante 24 horas completas, a 35° C, embora seja necessário confirmação pela CIM. O uso de uma cepa de controle de qualidade sensível, como a *S. aureus* ATCC® 29213, é crítico para garantir a especificidade. Só quando forem publicados dados adicionais sobre a prevalência ou significância clínicas desses isolados, os laboratórios poderão decidir examinar, com maior cuidado, cepas de MRSA com CIMs elevadas contra vancomicina.

Em julho e outubro de 2002 foram publicados relatos sobre duas cepas de *S. aureus* com CIMs de 1024 µg/mL e 32 µg/mL. Ambas as cepas continham o gene *vanA* similar ao encontrado nos enterococos<sup>13,14</sup>. Essas cepas puderam ser detectadas por meio de um teste de disco-difusão, sendo que os halos de inibição foram examinados usando luz transmitida, após 24 horas completas de incubação, a 35° C.

## 7.2 Enterococos

### 7.2.1 Resistência à Penicilina/Ampicilina

Os enterococos podem ser resistentes à penicilina e à ampicilina, devido à produção de proteínas de baixa afinidade ligadoras de penicilina (PBPs) ou, com menos frequência, devido à produção de β-lactamase. O

teste de disco-difusão pode detectar, com precisão, isolados com PBPs alteradas, mas não detectará, de maneira confiável, as cepas que produzem  $\beta$ -lactamase. Essas últimas são raras, e a melhor maneira de detectá-las é usando um teste de  $\beta$ -lactamase baseado em nitrocefina (ver a Seção 8). Um teste positivo para  $\beta$ -lactamase prediz a resistência à penicilina, bem como às amino-, às carboxi- e às ureidopenicilinas. Certos enterococos resistentes à penicilina ou à ampicilina podem apresentar altos graus de resistência (i.e., CIMs  $\geq$  128  $\mu\text{g/mL}$  para penicilina ou CIMs  $\geq$  64  $\mu\text{g/mL}$  para ampicilina). O teste de disco não distinguirá os isolados com baixo grau de resistência daqueles apresentando alto grau de resistência. Os enterococos com baixo grau de resistência (penicilina  $\leq$  64  $\mu\text{g/mL}$  ou ampicilina  $\leq$  32  $\mu\text{g/mL}$ ) podem ser sensíveis à ação sinérgica dessas penicilinas em combinação com gentamicina ou estreptomicina (na ausência de alto grau de resistência) se forem ministradas altas doses de penicilina, enquanto que cepas com níveis mais altos (penicilina  $>$ 64  $\mu\text{g/mL}$  ou ampicilina  $>$ 32  $\mu\text{g/mL}$ ) podem não ser sensíveis ao efeito sinérgico desta associação<sup>15,16</sup>. Deve-se considerar pedidos médicos de determinação da CIM real para penicilina ou ampicilina para amostras de enterococos isolados em sangue e líquido céfalo-raquidiano.

### 7.2.2 Resistência à Vancomicina

A detecção acurada dos enterococos resistentes à vancomicina pelo teste de disco-difusão requer que as placas sejam incubadas por 24 horas completas (ao invés de 16 a 18 horas) e que qualquer halo de inibição ao redor do disco de vancomicina seja examinado cuidadosamente com luz transmitida para checar a existência de pequenas colônias ou de um filme de crescimento dentro do halo de inibição. Um resultado de categoria intermediária no teste de disco-difusão deve ser verificado determinando-se a CIM da vancomicina, conforme descrito no documento M7—*Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically* do NCCLS.

### 7.2.3 Alto Grau de Resistência a Aminoglicosídeos

Um alto grau de resistência a aminoglicosídeos indica que haverá perda do sinergismo entre a combinação de uma penicilina ou um glicopeptídeo com um aminoglicosídeo para o isolado de enterococos.<sup>15</sup> Pode-se usar discos especiais com altas concentrações de gentamicina (120  $\mu\text{g}$ ) e estreptomicina (300  $\mu\text{g}$ ) para verificar esse tipo de resistência. Nenhum halo de inibição indica resistência e halos  $\geq$  10 mm indicam ausência de alto grau de resistência. As cepas que produzem halos entre 7 e 9 mm devem ser examinadas usando um teste de triagem dilucional, conforme descrito no documento M7—*Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically* do NCCLS. Consultar a tabela 3 para o controle de qualidade utilizados para os discos especiais com alta concentração de aminoglicosídeos. Não é necessário testar outros aminoglicosídeos, porque sua atividade contra os enterococos não é superior à da gentamicina ou à da estreptomicina.

## 7.3 Bacilos Gram-negativos Produtores de $\beta$ -Lactamase de Espectro Ampliado

As  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado (ESBLs) são enzimas resultantes de mutações nos genes mediadores das  $\beta$ -lactamases plasmidiais comuns, como TEM-1, TEM-2 e SHV-1. As ESBLs podem conferir resistência às penicilinas, às cefalosporinas e ao aztreonam em isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* e alguns outros gêneros da família das Enterobacteriaceae geralmente sensíveis a esses agentes<sup>17</sup>. Algumas dessas cepas mostram halos de inibição menores que a população normal sensível, assim, podendo assim, ser classificadas como sensíveis pelos pontos de corte padronizados para algumas cefalosporinas de amplo espectro ou aztreonam; é possível fazer a triagem dessas cepas para determinar seu potencial de produção de ESBL usando os pontos de corte relacionados no quadro no final da tabela 2A. Outras cepas podem produzir resultados intermediários ou resistentes a um ou mais agentes antimicrobianos, de acordo com os pontos de corte padronizados. Em todas as cepas com ESBLs, os diâmetros dos halos de inibição de uma ou mais cefalosporinas de espectro ampliado ou aztreonam devem aumentar na presença de ácido clavulânico (ver o quadro de ESBLs no final da tabela 2A). Para todas as cepas produtoras de ESBL, o resultado do teste deve ser interpretado e relatado como resistente a todas às penicilinas, às cefalosporinas e ao aztreonam. A tabela 1 apresenta as recomendações relativas a relatórios e testes adicionais atualmente vigentes e o quadro localizado no final da tabela 2A, os testes de triagem e

confirmatórios para ESBL.

## 8. Testes de $\beta$ -Lactamase

### 8.1 Finalidade

Um teste rápido de  $\beta$ -lactamase pode prover informações clínicas relevantes mais rapidamente que os resultados de um teste de disco-difusão em para *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae*, e *Moraxella catarrhalis*; é o único teste confiável para a detecção de *Enterococcus* spp. produtor de  $\beta$ -lactamase.

Um resultado positivo para  $\beta$ -lactamase prediz:

- resistência à penicilina, à ampicilina e à amoxicilina em *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae* e *M. catarrhalis*; e
- resistência à penicilina, assim como às amino-, às carboxi- e às ureidopenicilinas em estafilococos e enterococos.

Um teste de  $\beta$ -lactamase negativo não afasta a possibilidade de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos resultante de outros mecanismos. Não se recomenda testar membros das Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* spp. e outros bacilos gram-negativos aeróbicos, porque os resultados podem não predizer sensibilidade aos  $\beta$ -lactâmicos mais frequentemente usados na terapia.

### 8.2 Seleção de um Teste de $\beta$ -Lactamase

Os testes baseados em nitrocefim são o método de preferência para testes de *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae*, *M. catarrhalis*, estafilococos e enterococos.<sup>18</sup> Os testes acidimétricos de  $\beta$ -lactamase têm produzido, em geral, resultados aceitáveis para *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae* e estafilococos. Os testes iodométricos podem ser usados para testar *N. gonorrhoeae*, mas apenas os testes baseados em nitrocefim devem ser usados para testar *M. catarrhalis*.<sup>19</sup>

A detecção acurada da produção de  $\beta$ -lactamase por estafilococos pode exigir a indução da produção da enzima e incubação de um teste baseado em nitrocefim durante até uma hora. A indução pode ser realizada facilmente testando uma amostra isolada da margem do halo de inibição do disco de oxacilina. É necessário cuidado no uso desses ensaios, de maneira a assegurar resultados acurados, incluindo testes de cepas de controle conhecidas positivas e negativas quando os isolados clínicos forem examinados.

## 9. Interpretação dos Resultados dos Testes de Disco-Difusão

### 9.1 Padrões de Interpretação do Diâmetro dos Halos

As tabelas 2A a 2I indicam os critérios de interpretação do diâmetro dos halos de inibição de maneira a classificar com precisão os níveis de sensibilidade dos organismos a diversos agentes antimicrobianos. Para a maioria dos agentes, essas categorias foram desenvolvidas comparando, inicialmente, os diâmetros dos halos às CIMs de um grande número de isolados, incluindo aqueles com mecanismos de resistência conhecidos e relevantes para a classe específica de droga antimicrobiana. Posteriormente, estas CIMs e os diâmetros dos halos correlacionados foram analisados em relação à farmacocinética da droga em regimes terapêuticos normais. A seguir, sempre que possível, os critérios interpretativos determinados *in vitro* foram analisados em relação a estudos de eficácia clínica no tratamento de patógenos específicos, conforme apresentado no documento M23— *Development of In Vitro Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters* do NCCLS.

### 9.2 Categorias Interpretativas

### 9.2.1 Sensível

A categoria “sensível” significa que uma infecção por uma determinada cepa pode ser tratada adequadamente com a dose do agente antimicrobiano recomendada para esse tipo de infecção e patógeno, exceto quando contra-indicado .

### 9.2.2 Intermediária

A categoria “intermediária” inclui isolados com CIMs do agente antimicrobiano que se aproximam de níveis sangüíneos e tissulares atingíveis e para os quais as taxas de resposta podem ser inferiores àquelas apresentadas por isolados sensíveis. A categoria “intermediária” implica eficácia clínica nos sítios corpóreos, onde as drogas se concentram fisiologicamente (ex., quinolonas e  $\beta$ -lactâmicos na urina) ou quando for possível utilizar uma dosagem maior da droga que a normal (ex.,  $\beta$ -lactâmicos). Essa categoria também inclui uma zona-tampão, a qual deverá impedir que pequenos fatores técnicos não sujeitos a controle causem discrepâncias importantes na interpretação, especialmente no caso de drogas com pequenas margens de farmacotoxicidade.

### 9.2.3 Resistente

As cepas “resistentes” não são inibidas pelas concentrações sistêmicas dos agentes antimicrobianos geralmente atingíveis nos regimes terapêuticos habituais; e/ou podem ter os diâmetros do halo de inibição dentro de uma faixa de maior probabilidade de ocorrência de mecanismos específicos de resistência microbiana (ex.,  $\beta$ -lactamases), além de a eficácia clínica não ter sido confiável nos estudos terapêuticos.

## 9.3 Pontos de Corte Equivalentes à CIM

Os diâmetros dos halos de inibição nos testes de disco-difusão estão inversamente correlacionados às CIMs dos testes de diluição padronizados. As tabelas 2A a 2I relacionam os pontos de corte das CIMs que correspondem aos critérios interpretativos dos diâmetros dos halos de inibição. Esses correlatos das CIMs se baseiam em comparações entre os diâmetros do halo e as CIMs e, em geral, são idênticos aos critérios interpretativos das CIMs definidos no documento M7—*Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically* do NCCLS. Pode haver algumas pequenas discrepâncias devidas a diferenças técnicas nas bases de dados originais.

## 10. Controle de Qualidade

### 10.1 Finalidade

A meta do programa de controle de qualidade é monitorar os seguintes elementos:

- precisão (e reprodutibilidade) e acurácia dos testes de sensibilidade;
- desempenho dos reagentes usados nos testes; e
- desempenho das pessoas que realizam os testes e fazem a leitura dos resultados.

A melhor maneira de alcançar essa meta depende de, embora sem limitar-se a, testes de cepas de controle de qualidade com sensibilidade conhecida aos agentes antimicrobianos a serem testados.

### 10.2 Cepas de Referência para o Controle de Qualidade

Para controlar a precisão (reprodutibilidade) e acurácia dos testes de disco-difusão, é necessário dispor de várias cepas de controle de qualidade, obtidas de fonte confiável. As cepas de controle de qualidade recomendadas incluem as seguintes.

- *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212;
- *Escherichia coli* ATCC® 25922;
- *Escherichia coli* ATCC® 35218;
- *Haemophilus influenzae* ATCC® 49247;
- *Haemophilus influenzae* ATCC® 49766;
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 700603;
- *Neisseria gonorrhoeae* ATCC® 49226;
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853;
- *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923; and
- *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619.

*Escherichia coli* ATCC® 35218 é recomendada apenas como cepa controle para combinações de inibidores das β-lactamases, como aquelas contendo ácido clavulânico, sulbactam, ou tazobactam.

*Enterococcus faecalis* ATCC® 29212 (ou, alternativamente, *Enterococcus faecalis* ATCC® 33186) é recomendada para o monitoramento da presença, no ágar Mueller-Hinton, de níveis inaceitáveis de timidina para os testes com trimetoprim ou sulfonamidas.

*Enterococcus faecalis* ATCC® 29212 também é utilizado para controlar discos com altas concentrações de aminoglicosídeos (Tabela 3).

*Haemophilus influenzae* ATCC® 49247 é um organismo não produtor de β-lactamase, resistente à ampicilina. *Haemophilus influenzae* ATCC® 49766 é um organismo sensível à ampicilina, mas que confere resultados mais reprodutíveis que a cepa de *H. influenzae* ATCC® 49247 para o controle de determinados β-lactâmicos.

*Klebsiella pneumoniae* ATCC® 700603 é usada como controle nos testes de ESBL (Tabela 2A).

### 10.3 Armazenamento de Cepas de Controle de Qualidade

- As cepas de controle de qualidade devem ser testadas usando o teste padronizado de disco-difusão, descrito no presente documento, usando os mesmos materiais e métodos empregados para testes de isolados clínicos.
- No caso de armazenamento prolongado, essas culturas de referência devem ser mantidas a temperatura de -20° C, ou menos, (de preferência a -60° C ou menos, ou em nitrogênio líquido) em meio estabilizador adequado (ex., em caldo de soro fetal bovino a 50%, em caldo de soja tríptica a 10-15% de glicerol sangue ovino desfibrinado, ou leite desnatado), ou liofilizadas, sem risco significativo de alteração de sua sensibilidade antimicrobiana.
- As culturas das cepas controle em uso devem ser armazenadas em ágar de soja tríptica (cepas não fastidiosas) ou em ágar chocolate enriquecido (cepas exigentes), a temperatura de 2 a 8° C, fazendo-se

uma subcultura toda semana durante, no máximo, três semanas consecutivas. As culturas em uso devem ser preparadas pelo menos mensalmente, a partir de culturas congeladas, liofilizadas, ou comerciais.

- Antes do teste, deve-se fazer subculturas das cepas em placas de ágar, a fim de se obter colônias isoladas. As culturas congeladas ou liofilizadas devem ser subcultivadas por duas vezes antes da realização dos testes de sensibilidade.
- As colônias são cultivadas ou suspensas para os testes de acordo com as técnicas recomendadas de preparação de inóculos.
- A cultura das cepas de controle de qualidade pode ser usada para monitorar a precisão (reprodutibilidade) e acurácia do teste de disco, contanto que não ocorra mudança significativa na média do diâmetro do halo de inibição que não possa ser atribuída a falha metodológica. Se um resultado inexplicado sugere uma mudança de sensibilidade inerente ao organismo, recomenda-se obter uma cultura fresca da cepa de controle.
- Atenção especial à manutenção do organismo (ex., subcultivos mínimos) e a seu armazenamento (ex., -60 °C ou menos) são particularmente importantes para as cepas de controle de qualidade *E. coli* ATCC 35218 e *K. pneumoniae* ATCC 700603, visto que tem sido documentada a perda espontânea do plasmídeo que codifica a β-lactamase. Isso pode levar a resultados de controle de qualidade além dos limites aceitáveis, como diâmetros dos halos de inibição maiores para *E. coli* ATCC 35218 com as penicilinas enzima-lábeis (ex., ampicilina, piperacilina, ticarcilina) e dos halos de inibição maiores para *K. pneumoniae* ATCC 700603 com as cefalosporinas e aztreonam.

## 10.4 Limites de Controle de Qualidade do Diâmetro dos Halos

Os limites aceitáveis de diâmetros do halo para fins de controle de qualidade para apenas um teste (combinação de uma droga/um organismo) estão relacionados nas tabelas 3 e 3A. O desempenho geral do sistema de testes deve ser monitorado usando essas faixas por meio de testes das cepas controle apropriadas todo dia em que o teste for realizado ou, caso tenha sido documentado desempenho satisfatório semanalmente (ver Seção 10.5.2.1)

## 10.5 Frequência dos Testes de Controle de Qualidade (Reportar-se também ao Apêndice A.)

### 10.5.1 Testes Diários

Quando os testes de controle de qualidade são efetuados diariamente, para cada combinação agente antimicrobiano/organismo, 1 dentre cada 20 resultados consecutivos pode estar fora da faixa aceitável (baseado em intervalos de confiança de 95%). Qualquer resultado que exceda o limite de 1 dentre 20 testes consecutivos exigirá ação corretiva (ver Seção 10.6).

### 10.5.2 Testes Semanais

10.5.2.1 Demonstrando Desempenho Satisfatório para Conversão da Frequência dos Testes de Controle de Qualidade, passando de Diários para Semanais

- Teste todas as cepas de controle pertinentes durante 20 a 30 dias consecutivos de teste e documente os resultados.
- Para passar a frequência dos testes de controle de qualidade de diários para semanais, no máximo 1 dentre 20, ou 3 dentre 30 diâmetros de halos de inibição para cada combinação agente antimicrobiano/organismo pode estar fora dos limites aceitáveis de diâmetro da zona que constam das tabelas 3 e 3A.

10.5.2.2 Implementando Testes de Controle de Qualidade Semanais

- Os testes de controle de qualidade podem ser realizados semanalmente após ter documentado desempenho satisfatório (ver Seção 10.5.2.1).
- Realize testes de controle de qualidade uma vez por semana e sempre que qualquer reagente do teste (ex., um novo lote de ágar ou um novo lote de discos do mesmo, ou de um outro, fabricante) for mudado.
- Sempre que algum resultado dos testes semanais de controle de qualidade estiver fora da faixa aceitável, faz-se necessário implementar ação corretiva (ver Seção 10.6).
- Se um novo agente antimicrobiano for acrescentado, o mesmo deve ser testado durante 20 ou 30 dias consecutivos de desempenho satisfatório, documentado antes de passar para uma frequência semanal de testes de controle de qualidade. Além disso, 20 ou 30 dias de testes serão necessários sempre que houver uma mudança importante no método de leitura dos resultados dos testes, como a conversão de mensuração manual dos halos de inibição para a leitura automatizada.

## **10.6 Ação Corretiva**

### **10.6.1 Resultado em Desacordo com o Controle Devido a um Erro Evidente**

Se existir uma razão evidente para o resultado fora dos padrões, incluindo:

- uso do disco errado;
- uso da cepa de controle errada;
- contaminação evidente da cepa; ou
- uso inadvertido de condições ou temperatura de incubação erradas,

documente a razão do erro e teste novamente a cepa no dia em que o erro for observado. Se os resultados da retestagem estiverem dentro dos limites, não será necessário tomar qualquer outra medida corretiva.

### **10.6.2 Resultado em Desacordo com o Controle Devido a Erro Não Evidente**

#### **10.6.2.1 Ação Corretiva Imediata**

Se não existir uma razão evidente para o resultado fora dos padrões, medidas corretivas imediatas serão necessárias.

- Teste a combinação agente antimicrobiano/organismo em questão no dia que o erro for observado e acompanhe os testes durante cinco dias consecutivos. Documente todos os resultados.
- Se as cinco mensurações de diâmetro da zona para a combinação agente antimicrobiano/organismo estiverem dentro da faixa aceitável, conforme definido nas tabelas 3 e 3A, não será necessário executar ação corretiva adicional.
- Se qualquer das cinco mensurações de diâmetro da zona estiver fora da faixa aceitável, será necessário tomar medidas corretivas (ver Seção 10.6.2.2).
- Será necessário continuar a realizar testes diários de controle de qualidade até solucionar o problema.

### 10.6.2.2 Ação Corretiva Adicional

Quando ação corretiva imediata não resolve o problema, é provável tratar-se de um erro de sistema versus um erro aleatório. As seguintes fontes de erros mais comuns devem ser investigadas para certificar-se de que:

- os diâmetros de zona estão sendo medidos e transcritos corretamente;
- o controle de turbidez não expirou, está sendo armazenado corretamente, atende aos requisitos de desempenho (ver Seção 4.3) e foi agitado corretamente antes de ser usado;
- todos os materiais usados estão dentro do período de validade e armazenados à temperatura adequada;
- a temperatura e atmosfera da estufa são as corretas;
- outros equipamentos usados (ex., pipetas) estão funcionando corretamente;
- os discos são armazenados sem umidade e na temperatura correta;
- não houve mudanças nas cepas de controle, nem elas estão contaminadas;
- as suspensões de inóculo foram preparadas e ajustadas corretamente; e
- o inóculo para o teste foi preparado a partir de uma placa incubada pelo período adequado, que não ultrapassou mais de 24 horas.

Poderá ser necessário obter uma nova cepa de controle de qualidade (seja do congelador onde está armazenada ou de uma fonte confiável) e novos lotes de materiais (incluindo novo controle de turbidez), possivelmente de outros fabricantes. Se o problema parece estar relacionado com um determinado fabricante, ele deve ser contatado. Também é útil trocar cepas de controle de qualidade e materiais com outro laboratório que use o mesmo método. Até que o problema seja resolvido, poderá ser necessário usar um método alternativo de teste.

Quando o problema tiver sido resolvido, a fim de voltar ao esquema de testes semanais de controle de qualidade, é imprescindível documentar desempenho satisfatório durante outros 20 ou 30 dias consecutivos (ver Seção 10.5.2.1).

## 10.7 Relatando os Resultados Quando Ocorrem Testes Fora do Padrão

Sempre que ocorrer um resultado fora do padrão ou for necessário tomar uma medida corretiva, será preciso avaliar, cuidadosamente, se os resultados dos pacientes devem ser relatados individualmente, considerando que a fonte de erro, quando conhecida, pode afetar relevantemente estes resultados. As opções a serem consideradas incluem suprimir os resultados de um determinado agente antimicrobiano; revisar, retrospectivamente, os dados do paciente ou os dados acumulados para padrões incomuns; e usar uma metodologia alternativa, ou um laboratório de referência, até resolver o problema.

## 10.8 Verificação dos Resultados Clínicos

Diversos parâmetros dos testes são monitorados quando se adotam as recomendações de controle de qualidade descritas nesta Norma. Entretanto, resultados aceitáveis derivados dos testes de cepas de controle de qualidade não garantem resultados acurados nos testes de isolados clínicos. É importante revisar todos os resultados obtidos, de todas as drogas testadas, num isolado clínico antes de liberar os resultados. Isso inclui, sem se limitar a, assegurar-se de que: 1) os resultados de sensibilidade antimicrobiana são coerentes com a identificação do isolado; 2) os resultados de agentes individuais com uma classe específica de drogas

acompanham a hierarquia estabelecida pelos padrões de atividade (ex., as cefalosporinas de terceira geração são mais ativas que as cefalosporinas de primeira e segunda geração contra as Enterobacteriaceae); e 3) o isolado é sensível aqueles agentes para os quais ainda não foi documentada resistência (ex., vancomicina e *Streptococcus* spp.) e para os quais o único critério interpretativo na Norma M100 é o de “sensível”.

Os resultados incomuns ou incoerentes devem ser verificados checando os seguintes elementos: 1) erros de transcrição; 2) contaminação do teste (verificar novamente a pureza das colônias, etc.); e 3) resultados anteriores daquele paciente (ex., Esse paciente teve anteriormente um antibiograma incomum com o mesmo isolado?). Se não for possível descobrir a causa do resultado incomum ou incoerente, será necessário repetir o teste de sensibilidade ou a identificação do microorganismo, ou ambos. É útil, algumas vezes, usar uma metodologia alternativa para repetir o teste. A tabela 4 da Norma M100 apresenta uma lista de resultados que necessitam de verificação. Cada laboratório deve desenvolver suas próprias políticas de verificação de resultados incomuns ou incoerentes de testes de sensibilidade antimicrobiana. Essa lista deve enfatizar aqueles resultados que podem ter um impacto significativo no tratamento do paciente.

## 11. Limitações dos Métodos de Disco Difusão

### 11.1 Aplicação aos Vários Grupos de Organismos

Os métodos de disco-difusão descritos neste documento foram padronizados para testes de patógenos de crescimento rápido, que incluem *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., as Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e *V. cholerae*, e foram modificados para testes de alguns organismos fastidiosos, como *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae* e os estreptococos. Para os organismos excluídos das tabelas 2A a 2I (ex., *Campylobacter*, *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp.), os estudos ainda são insuficientes para desenvolver normas reprodutíveis definitivas para interpretar os resultados. Esses organismos podem exigir meios e atmosferas de incubação diferentes, ou mostram variações acentuadas na taxa de crescimento entre as cepas. Para esses microorganismos, recomenda-se consultar um especialista em doenças infecciosas para determinar se há necessidade de realizar testes de sensibilidade, bem como para interpretar os resultados. Os relatórios publicados na literatura médica e as recomendações consensuais em vigor sobre a terapia indicada para microorganismos incomuns podem afastar a necessidade de testes. Se necessário, um método de diluição será, em geral, o mais apropriado, e isso pode exigir que o organismo seja enviado a um laboratório de referência.

### 11.2 Resultados Não Confiáveis

Podem ocorrer resultados enganosos perigosos quando certos agentes antimicrobianos são testados e relatados como sensíveis contra organismos específicos. Essas combinações incluem os seguintes, embora possam não se limitar aos mesmos:

- cefalosporinas e aminoglicosídeos de primeira e segunda geração contra *Salmonella* e *Shigella* spp.;
- todos os agentes antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos (excetuando-se oxacilina, metilina e nafcilina) contra estafilococos resistentes a metilina;
- cefalosporinas, aminoglicosídeos (excetuando-se testes para detecção do alto grau de resistência), clindamicina e sulfametoxazol/trimetoprim contra enterococos; e
- cefalosporinas contra *Listeria* spp.

### 11.3 Surgimento de Resistência

Alguns agentes antimicrobianos estão associados com o surgimento de resistência durante cursos prolongados de tratamento. Assim, os isolados inicialmente sensíveis podem se tornar resistentes após o início do tratamento. Isso acontece nos três ou quatro primeiros dias, com mais frequência em *Enterobacter*,

*Citrobacter* e *Serratia* spp. com as cefalosporinas de terceira geração; em *P. aeruginosa* com todos os agentes antimicrobianos; e nos estafilococos com as quinolonas.

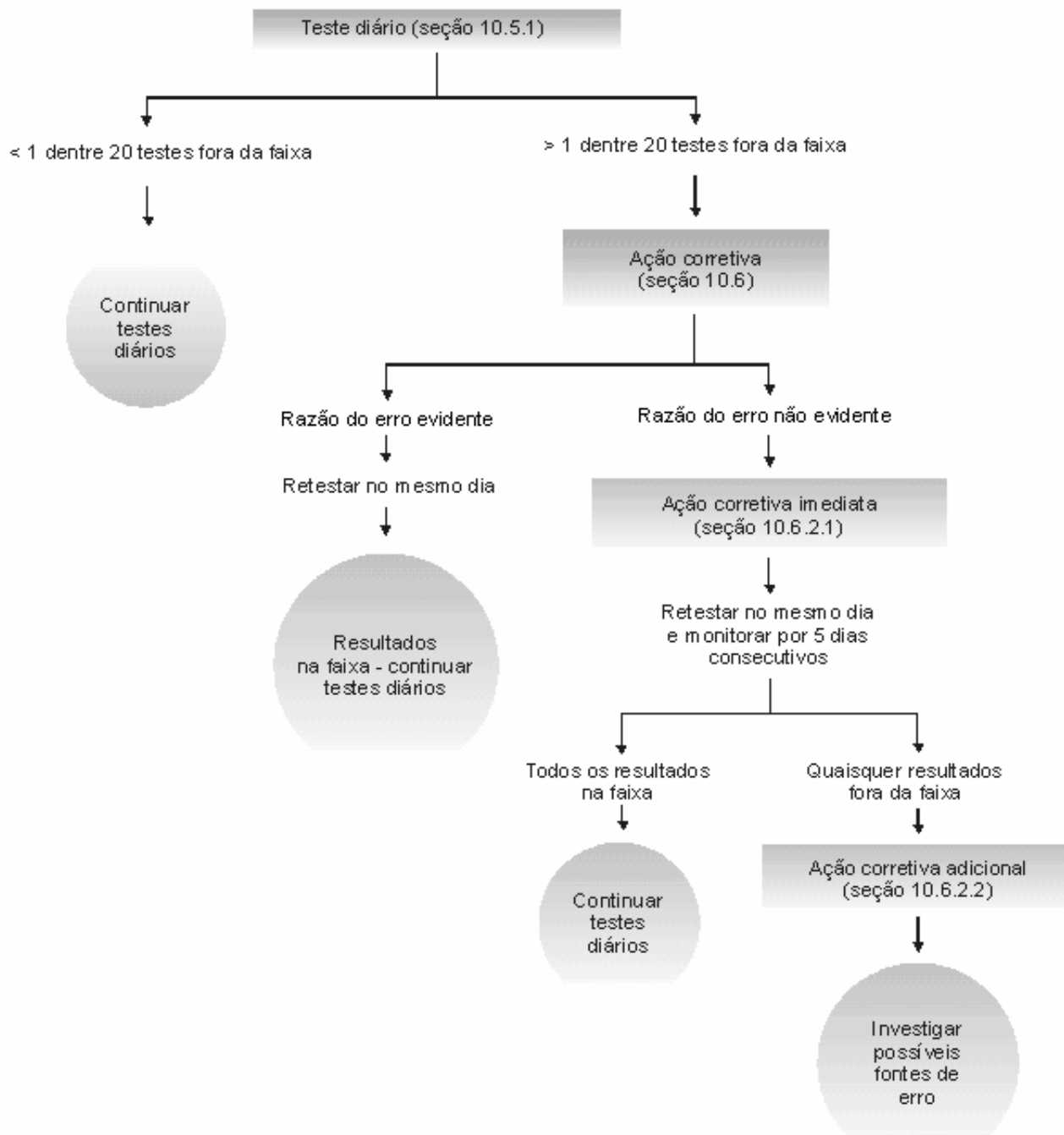
Em certas circunstâncias, justifica-se a repetição dos testes antes mesmo dos três ou quatro dias iniciais, sendo que a decisão de retestar só exige conhecimento da situação específica e da gravidade da condição clínica do paciente. As diretrizes laboratoriais relativas à repetição dos testes devem ser definidas após consulta ao corpo clínico.

## Referências Bibliográficas

- <sup>1</sup> Ericsson HM, Sherris JC. Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1971;217(suppl B):1-90.
- <sup>2</sup> Rules and Regulations, Antibiotic Susceptibility Discs. *Federal Register.* 1972;37:20525-20529.
- <sup>3</sup> Rules and Regulations, Antibiotic Susceptibility Discs: Correction. *Federal Register.* 1973;38:2756.
- <sup>4</sup> Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 1966;45:493-496.
- <sup>5</sup> Jorgensen JH, Redding JS, Maher LA, Howell AW. Improved medium for antimicrobial susceptibility testing of *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol.* 1987;25:2105-2113.
- <sup>6</sup> Jones RN, Gavan TC, Thornsberry C, et al. Standardization of disk diffusion and agar dilution susceptibility tests for *Neisseria gonorrhoeae*: Interpretive criteria and quality control guidelines for ceftriaxone, penicillin, spectinomycin, and tetracycline. *J Clin Microbiol.* 1989;27:2758-2766.
- <sup>7</sup> Jorgensen JH, Swenson JM, Tenover FC, et al. Development of interpretive criteria and quality control limits for broth microdilution and disk diffusion antimicrobial susceptibility testing of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 1994;32:2448-2459.
- <sup>8</sup> Schwalbe RS, Stapleton JT, Gilligan PH. Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci. *N Engl J Med.* 1987;316:927-931.
- <sup>9</sup> Kremery V Jr., Trupl J, Drogna L, Kukuckova E, Oravcova E. Nosocomial bacteremia due to vancomycin-resistant *Staphylococcus epidermidis* in four patients with cancer, neutropenia, and previous treatment with vancomycin. *Eur J Clin Microbiol Inf Dis.* 1996;15:259-261.
- <sup>10</sup> Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta, T Oguri, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother.* 1997;40:135-136.
- <sup>11</sup> Centers for Disease Control and Prevention. Update: *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin - United States. *MMWR.* 1997;46:813-815.
- <sup>12</sup> Tenover FC, Lancaster MV, Hill BC, Steward CD, Stocker SA, Hancock GA, et al. Characterization of staphylococci with reduced susceptibility to vancomycin and other glycopeptides. *J Clin Microbiol.* 1998; 36:1020-1027.
- <sup>13</sup> Centers for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin. *MMWR.* 2002;51(26):565-567.
- <sup>14</sup> Centers for Disease Control and Prevention. Public Health Dispatch: Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *MMWR.* 2002;51(40):902.
- <sup>15</sup> Torres C, Tenario C, Lantero M, Gastañares, Baquero F. High-level penicillin resistance and penicillin-gentamicin synergy in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37:2427-2431.
- <sup>16</sup> Murray BE. Vancomycin-resistant enterococci. *Am J Med.* 1997;102:284-293.
- <sup>17</sup> Jacoby GA, Medeiros AA. More extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991;35:1697-1704.

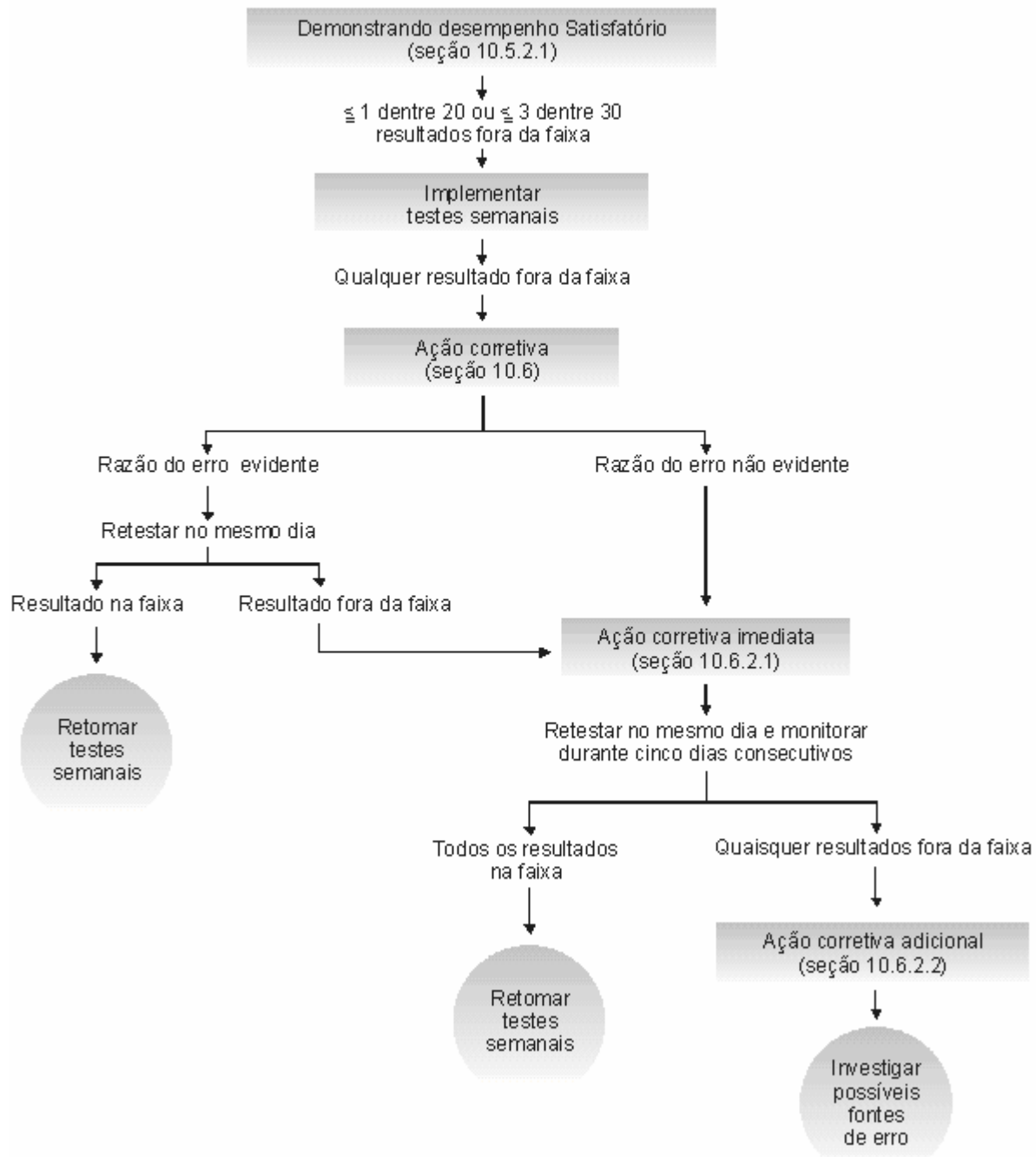
- <sup>18</sup> Swenson JM, Hindler JA, Peterson LR. Special tests for detecting antibacterial resistance. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999:1563-1577.
- <sup>19</sup> Doern GV, Tubert TA. Detection of  $\beta$ -lactamase activity among clinical isolates of *Branhamella catarrhalis* with six different  $\beta$ -lactamase assays. *J Clin Microbiol*. 1987;25:1380-1383.

**Apêndice A. Fluxograma do protocolo de controle de qualidade**  
**Protocolo de teste diário de controle de qualidade da disco difusão**



## Apêndice A. (Continuação)

### Protocolo de teste diário de controle de qualidade da disco difusão



Os procedimentos consensuais do NCCLS incluem o processo de recurso descrito, detalhadamente, na Seção 0 dos Procedimentos Administrativos. Para mais informações, favor contactar os Escritórios Executivos ou visitar nosso website em [www.nccls.org](http://www.nccls.org).

## Resumo dos Comentários e Respostas do Subcomitê

### M2-A7: *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Seventh Edition*

#### Geral

1. Estou procurando diretrizes relativas à frequência ótima para repetição de testes de sensibilidade em isolados bacterianos obtidos do mesmo paciente sítio corpóreo. As normas M100-S9 apontam, na nota de rodapé nº 2, dois organismos/combinções antimicrobianas (*Staphylococcus* spp. versus as quinolonas e *Enterobacter*, *Citrobacter*, e *Serratia* spp. versus os cefens) como possíveis objetos de repetição de testes de susceptibilidade até três ou quatro dias após o início da terapia, mas não fornecem quaisquer recomendações gerais para a repetição do teste de susceptibilidade. Há qualquer outra informação disponível sobre essa questão?
  - **Conforme colocado na Seção 11.3, “Alguns agentes antimicrobianos estão associados com o surgimento de resistência durante terapia prolongada. Portanto, isolados inicialmente sensíveis podem se tornar resistentes após o início da terapia. Isso ocorre nos três ou quatro primeiros dias, mais frequentemente em *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Serratia* spp. com as cefalosporinas de terceira geração; em *P. aeruginosa* com todos os agentes antimicrobianos; e nos estafilococos com as quinolonas.” Relutamos em definir o número de dias antes de se repetir o teste porque sabemos que não retestar um isolado pode levar a um grave erro médico. Em certas circunstâncias, o teste pode ser repetido antes dos três ou quatro dias, com base na situação específica e na gravidade da condição clínica do paciente. As diretrizes laboratoriais sobre quando repetir o teste de sensibilidade devem ser determinadas após consulta com o corpo clínico. Ao gerar antibiogramas, os resultados dos retestes devem ser excluídos, conforme recomendado pela Norma M39 do NCCLS – *Analysis and Presentation of Cumulative Antimicrobial Susceptibility Test Data*.**
2. Examinando o documento sobre a padronização do teste de sensibilidade a antimicrobianos por disco difusão publicado em janeiro de 2000 (M2-A7), percebi que as instruções sobre o uso de sistemas comerciais de preparo do inóculo (ex., Prompt®) e gabaritos para a leitura do tamanho dos halos de inibição foram eliminadas. Poderia saber o significado desses usos terem sido eliminados e por que isso aconteceu? Especificamente, gostaria de saber se essas práticas não são mais recomendadas (visto o silêncio da NCCLS a esse respeito) e, se esse é o caso, por que. Usamos Prompt e os gabaritos desde meados da década de 1980 e nunca tivemos problemas com controle de qualidade ou qualquer outra coisa.
  - **O subcomitê concorda que, uma vez que os sistemas comerciais de preparação de inóculo não tenham sido avaliados em qualquer estudo revisado por este subcomitê, não poderíamos recomendar seu uso. Entretanto, o laboratório pode realizar uma avaliação interna do método para determinar sua equivalência ao método de referência para o preparo do inóculo. Quanto ao uso de gabaritos, queríamos incentivar a leitura e o registro dos diâmetros reais dos halos de inibição, o que é impossibilitado pelo uso de gabaritos. Além disso, a mudança nos critérios interpretativos do M100 não pode ser atualizada nos gabaritos a todo momento.**

#### Seção 4.1.4 e Tabela 3

3. Nosso laboratório recebeu uma falta de Fase II durante uma inspeção do CAP devido a termos interrompido os testes de *E. faecalis* 29212 com Sulfametoxazol/Trimetropim para níveis baixos de timidina como referência à Nota 1 da Tabela 3 da M100-S12 (disco difusão). Nossa interpretação da Nota 1 é que esse teste não é mais necessário, embora seja sempre uma opção. Nossa interpretação é correta e descontinuar os testes para *E. faecalis* 29212 é apropriado?
- **Os atuais lotes de ágar Mueller-Hinton estão essencialmente livres de timidina e timina. O protocolo do M6-A—*Protocols for Evaluating Dehydrated Mueller-Hinton Agar* usado pelos fabricantes do ágar Müller-Hinton determina que os meios aceitáveis (e, conseqüentemente, rotulados ‘testado pelo protocolo M6) devem ser checados para esse componente. Portanto, a necessidade de testar os atuais lotes não é tão crítica quanto costumava ser. Na nova redação, a M2 (Seção 4.1.4), Tabela 3, determina que o teste de *E. faecalis* ATCC 29212 ou *E. faecalis* ATCC 33186 contra Sulfametoxazol/Trimetropim é opcional, mas deve ser considerado se ocorrerem problemas de controle de qualidade com os outros organismos ao testaras sulfonamidas ou trimetropim.**

### Seção 5.2

4. Estamos implementando suas normas para os testes de sensibilidade bacteriana por disco-difusão (M2-A6), como muitos outros laboratórios no Reino Unido, mas estamos tendo problemas com a inoculação das placas (Seção 5.2). Anteriormente, usávamos a bandeja rotativa para semeá-las, que acreditamos oferecer uma melhor definição dos halos de inibição. Essa norma proíbe o uso destes dispositivos? E, se esse for o caso, qual é o raciocínio subjacente?
- **Como toda variação de um método padronizado (ver o comentário 2), para determinar a equivalência do uso da bandeja rotativa na inoculação rotineira em três planos da placa de disco-difusão, o laboratório pode realizar estudos que mostrem que este método de inoculação é equivalente e que as faixas de controle de qualidade estão dentro dos limites esperados.**

### Seção 6.5.1

5. Na Norma M7-A5, Seção 9.2.1 (M2-A7, Seção 6.5.1), o NCCLS recomenda a determinação da CIM para *E. faecium* (recuperado de sangue ou líquido céfalo-raquidiano) para ampicilina e penicilina. Isso é feito para testar possível sinergismo com os aminoglicosídeos. Não consigo achar isso na Norma M100-S11. Esta recomendação ainda é válida?
- **Na Norma M2-A8, continuamos a sugerir que, no caso de cepas de *E. faecium* resistentes à penicilina ou à ampicilina, pode ser apropriado determinar as CIMs reais, uma vez que as cepas com CIMs para penicilina  $\leq 64$   $\mu\text{g/mL}$  ou CIMs para ampicilina  $\leq 32$   $\mu\text{g/mL}$  podem responder ao tratamento com uma combinação de  $\beta$ -lactâmico + aminoglicosídeo, quando não há um alto grau de resistência aos aminoglicosídeos. Entretanto, uma vez que isso é uma etapa opcional, que pode valer a pena somente em raras circunstâncias, quando solicitado por um infectologista tratando de um paciente com infecção grave, acreditamos ser apropriado mencioná-lo apenas no texto e não nas tabelas. O teste pode ser realizado usando uma metodologia dilucional como diluição em ágar ou microdiluição em caldo.**

### Tabelas

6. Entendemos que existem padronizações atuais para testar *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Acinetobacter* spp., mas não sabemos se há padronizações para quaisquer outros membros desse grupo. Temos considerado várias opções para os testes de sensibilidade desses organismos incomuns, da seguinte maneira.
  1. Declarar que não existem padronizações dos testes de sensibilidade para estas espécies e que, portanto, não é possível realizá-los.

2. Fazer a determinação da CIM em caldo e informar os resultados sem interpretação S, I, R, anexando um comentário sobre a indisponibilidade de um teste de referência validado em uso e o fato de que os dados de sensibilidade não se correlacionam necessariamente à resposta clínica.
  3. Enviar o isolado a um laboratório de referência.
- **Só existe metodologia para testes de disco-difusão para bacilos gram-negativos, não-fermentadores de glicose e não-exigentes como, *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. Além disso, acrescentou-se um comentário geral à Tabela 2B no sentido de que é possível testar isolados de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes de fibrose cística, mas que pode ser necessário incubá-los por até 24 horas. O subcomitê está trabalhando atualmente nos comentários para o teste por disco-difusão de ambos *S. maltophilia* e *B. cepacia*. Enquanto isso, esses organismos (e outros pertencentes a este grupo) podem ser testados por um método dilucional e os resultados, interpretados usando os pontos de corte indicados para outras não-Enterobacteriaceae fornecidos na Tabela 2B da Norma M7 (ver o comentário geral 1 nessa tabela).**

**Publicações Afins da NCCLS<sup>1</sup>**

- GP2-A4 Clinical Laboratory Technical Procedure Manuals; Approved Guideline—Fourth Edition (2002).** Esta norma descreve o desenho, a preparação, a manutenção e o uso de manuais técnicos de procedimentos (tanto formato eletrônico como impresso) para uso pela comunidade de laboratórios de patologia clínica.
- M6-A Protocols for Evaluating Dehydrated Mueller-Hinton Agar; Approved Standard (1996).** Este documento descreve os procedimentos para a avaliação de lotes de produção de ágar Mueller-Hinton, bem como o desenvolvimento e a aplicação de meios de referência.
- M7-A6 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition (2003).** A Norma M7-A6 discute os métodos de referência usados na determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) de bactérias aeróbicas por meio de macrodiluição em caldo, microdiluição em caldo e diluição em ágar.
- M11-A5 Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard—Fifth Edition (2001).** Esta norma fornece métodos de referência para a determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) de bactérias anaeróbicas por meio de macrodiluição em caldo, microdiluição em caldo e diluição em ágar.
- M23-A2 Development of *In Vitro* Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters; Approved Guideline—Second Edition (2001).** Este documento define os dados exigidos e recomendados para a seleção de padrões apropriados de interpretação e as diretrizes de controle de qualidade para os agentes antimicrobianos.
- M29-A2 Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Second Edition (2001).** Este documento fornece orientação sobre os riscos de transmissão das hepatites virais e do vírus da imunodeficiência humana no contexto do laboratório; precauções específicas para a prevenção da transmissão laboratorial de infecções transmitidas pelo sangue através de instrumentos e materiais de laboratório; e recomendações para a conduta em casos de exposição a microorganismos transmitidos pelo sangue.
- NRSCL8-A Terminology and Definitions For Use in NCCLS Documents; Approved Standard (1998).** Este documento fornece definições padronizadas para o uso das normas e diretrizes do NCCLS e para a apresentação de métodos e materiais de referência candidatos a adoção pelo Sistema Nacional de Referência para Laboratórios Clínicos.

---

<sup>1</sup> Documentos propostos e tentativos estão sendo apresentados através do processo consensual do NCCLS; portanto, os leitores deverão se reportar às edições mais recentes.

## ANOTAÇÕES

## ANOTAÇÕES

## ANOTAÇÕES

---

NCCLS □ 940 West Valley Road □ Suite 1400 □ Wayne, PA 19087 □ USA □ PHONE 610.688.0100  
FAX 610.688.0700 □ E-MAIL: [exoffice@nccls.org](mailto:exoffice@nccls.org) □ WEBSITE: [www.nccls.org](http://www.nccls.org) □ ISBN 1-56238-485-6

