

**1- SENSIBIODISC – CECON**

**Discos de Sensibilidade Bacteriana para Antibiograma Completo (Frascos ou Polidiscos)  
Produzidos de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo BrCAST e CLSI**

**2- Finalidade**

O método da difusão em agar através de discos impregnados com antibacterianos é empregado no laboratório para dar ao médico uma orientação terapêutica “in vitro”.

O antibiograma é recomendado para microrganismo de crescimento rápido, por exemplo: *Enterobactérias*, *Pseudomonas spp*, *Staphylococcus spp*, alguns *Streptococcus*, etc...

**3- Princípio de ação.**

O método utilizado é o recomendado é o de Kirby Bauer atualizado.

Basicamente são discos de papel impregnados com antibióticos e que são aplicados sobre superfícies de agar inoculados com os microrganismos em estudo. Estas placas são incubadas em estufa permitindo ao antibiótico se difundir inibindo ou não o crescimento bacteriano.

A sensibilidade ou resistência ao antibiótico se traduzirá na produção de um halo de inibição que poderá ser medido com régua ou paquímetro.

**4- Relação dos componentes e apresentação.**

Frasco com sílica gel (desumidificante e detector de umidade), espuma, rolha butílica reversível (para dificultar a entrada de ar e umidade) e 50 discos de papel (diâmetro 6,35 mm) impregnados com antibiótico na concentração especificada segundo normas dos órgãos: CLSI, FDA e Farmacopéia Brasileira, BrCAST ou embalagem com polidisco (12 antibióticos diversos) ou estojo com 12 frascos (série urinária, gram positiva e gram negativa) e estojo com 24 antibióticos.

**5- Relação de Materiais para a realização do teste não fornecidos.**

a) Meios de cultura apropriados aos microrganismos.

**• Na preparação do inóculo.**

Para organismos não exigentes em geral – utilizar Peptona Caseína Soja (TSB).

Para organismos exigentes – utilizar Mueller Hinton Caldo (MHB).

**• Na preparação da placa.**

Para bactérias em geral – utilizar meio padrão Mueller Hinton Agar (MHA).

Para bactérias fastidiosas utilizar Mueller Hinton Agar (MHA) + 5% de sangue de cavalo + 20mg/L de β-nad desfibrinado CECON e temperaturas adequadas descritas nos documentos BrCAST

b) Placas de Petri, tubos de ensaio, swbs, pipetas e solução fisiológica todos estéreis.

c) Pinça, alça de platina e bico de Bunsen (ou similar).

d) Tubo 0,5 da Escala de MacFarland - CECON para comparação da turbidez do inóculo (método Kirby Bauer).

e) Estufa de 35° a 37°C.

f) Régua ou paquímetro.

**6- Condições de armazenamento e transporte.**

• Os frascos (ou polidiscos) em uso devem ser mantidos em temperatura abaixo de 8°C

• Os frascos (ou polidiscos) em estoque poderão ser colocados em freezer.

• A estabilidade do antibiótico permanece inalterada se as embalagens permanecerem intactas (Os frascos com vácuo e fechados) permanecerem a 38°C por até 15 dias (em isopor).

• Após a primeira abertura dos frascos, se não for feito vácuo, consumir os discos num prazo máximo de 60 dias, mantidos em geladeira.

• No transporte não há necessidade do uso de gelo.

**7- Descrição das precauções e cuidados no manuseio do produto.**

• Somente para uso diagnóstico “in vitro”.

• Não comer, beber ou fumar na área onde vai ser realizado o teste.

- Usar luvas e avental quando for manusear o produto.
- Lavar as mãos antes e após o manuseio do produto.
- Não pipetar com a boca.
- Evitar contaminação microbiana dos reagentes quando utilizar os frascos do produto.
- Usar pipetas esterilizadas e pipetas com filtros.
- Trabalhar sempre próximo ao bico de Bunsen.
- Não usar o produto com a data de validade vencida.
- Este produto deverá ser usado somente por técnico supervisionado por microbiologista qualificado ou pelo próprio.
- Autoclavar a 121°C por trinta minutos todo o material contaminado usado no teste e somente depois descartar.
- Para a limpeza e desinfecção do local de trabalho utilizar qualquer solução bactericida: álcool etílico ou isopropílico a 65 – 85%, compostos quaternários de amônio, fenol a 0,5 – 5,0%, etc...

### 8- Orientação e cuidado com a amostra biológica.

- O material biológico deverá ter sido colhido antes da administração do antibiótico ou pelo menos 48h. após a última dose (com exceção dos antibióticos de ação prolongada).
- A amostra deverá ter sido coletada corretamente e acondicionada adequadamente visando a sua estabilidade e enviada o mais rapidamente possível ao local do exame.
- Repicar o material logo para evitar a morte de organismos sensíveis à mudança de temperatura e meio ambiente.

### 9- Metodologia

#### 9.1- Procedimento

**a)** Preparar e esterilizar 60mL de Mueller-Hinton Agar (MHA) e passar para uma placa de Petri de 150 mm de diâmetro ou 25mL se a placa de Petri for de 90 mm de diâmetro. Aguardar 30 minutos para uma completa solidificação. Esta solidificação pode ser feita em estufa à 37°C para total evaporação das gotas de água de condensação formadas sobre a superfície do meio de cultivo.

**Nota:** Para organismos de difícil crescimento como *Streptococcus spp*, *Gonococos spp*, *Haemophilus spp*, 5% de sangue desfibrinado de cavalo, carneiro, ou mesmo humano (se for isento de substâncias inibidoras) pode ser adicionado ao meio e “achocolatado” quando for indicado.

**b)** Repicar com alça de repique em 5mL de meio de cultivo caldo MHB – (Mueller-Hinton Caldo), uma quantidade não inferior a 3 colônias idênticas do organismo a ser testado. Incubar o caldo inoculado por 2 a 8 horas à temperatura exigida pelo organismo (normalmente 35 – 37°C).

**Nota:** Não usar organismos de cultivo misto pois o teste poderá dar resultado completamente errado.

**c)** Acertar a turbidez do crescimento em caldo (MHB) comparando com a turbidez de uma solução de sulfato de bário assim preparada: 0,5mL de cloreto de bário (BaCl<sub>2</sub>) a 1%, mais 99,5mL de uma solução de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a 1% (0,36N) – tubo 0,5 da Escala de MacFarland - CECON.

**Nota:** Não usar o inóculo obtido por crescimento durante uma noite (16 – 18h). Inóculos obtidos desta forma são densos e dão zonas de inibição pequenas. Por sua vez, inóculos demasiadamente ralos dão zonas de inibição maiores que a normal.

**d)** Umedecer um “swab” no caldo inóculo pressionando-o contra a parede do tubo para remover o excesso de caldo, e esfregá-lo nas várias direções sobre a superfície do meio contido na placa. Entreabrir a tampa da placa e deixar o esfregaço secar por 3 a 5 minutos.

**e)** Após preparar o esfregaço, depositar os discos (ou os polidiscos) sobre a superfície inoculada com o auxílio de uma pinça flambada e fria. Pressionar os discos para melhor aderência ao meio, mantendo-os a uma distância de aproximadamente 3 cm um do outro. Recomenda-se colocar apenas um antibacteriano de cada grupo. Os Polidiscos são indicados para cada grupo.

**f)** Após colocar os discos (ou Polidiscos), incubar a placa em posição invertida, por uma noite (16 – 18 – 24 h) à temperatura (35 – 37°C) e atmosfera apropriadas, de acordo com o antibacteriano e o organismo em teste.

**Nota:** Leituras de 4 a 6 horas poderão ser feitas em caso de emergência, mas leituras definitivas deverão ser feitas somente após o tempo estipulado.

**g)** Proceder as leituras dos halos de inibição com o auxílio de uma régua ou paquímetro, e interpretar os resultados de acordo com a tabela.

**Nota:** Não usar sinais para expressar os resultados. Usar as letras “S” para organismos sensíveis, “T” para organismos de sensibilidade intermediária e “R” para organismos resistentes. Um halo de inibição maior que o outro não indica propriamente uma maior atividade do antibacteriano sobre o organismo em teste. Outro fator tais como carga antibiótica, difusibilidade, etc., intervém na formação dos halos. Portanto deve ser utilizada a tabela recomendada na interpretação dos resultados.

**Considerações gerais:**

- a) Na leitura dos halos de inibição poderão ser observados alguns fenômenos como por exemplo, o aparecimento do véu do *Proteus* dentro do halo de inibição que deve ser ignorado.
- b) No caso de várias colônias se desenvolverem dentro da zona de inibição, a pureza da cepa deverá ser investigada. Se após esta observação as colônias ainda persistirem, o fato deverá ser comunicado juntamente com o resultado enviado ao clínico.
- c) O meio Mueller-Hinton Agar é o meio de cultivo mais recomendado, por oferecer melhores condições de crescimento aos principais patógenos.
- d) Na padronização do inóculo deve-se agitar o tubo 0,5 da Escala de MacFarland e o tubo teste. A observação da turvação deve ser feita mantendo os tubos lado a lado sobre um cartão branco com linhas horizontais pretas. De acordo com a nitidez na visualização das linhas deve-se acertar o inóculo, diluindo com salina estéril ou caldo reincubado ou adicionando mais colônias.
- e) Quando houver crescimento espaçado na superfície do agar repetir a padronização do inóculo e o teste.
- f) Se houver presença de poucas colônias na zona de inibição, subcultivar e repetir o teste.
- g) No caso de haver discreta resistência da oxacilina com *estafilococos* fazer a leitura após 24 h usando luz transmitida sendo significativo **QUALQUER** crescimento.
- h) Discreta resistência dos *enterococos* à vancomicina: fazer leitura após 24 h com luz transmitida sendo significativo **QUALQUER** crescimento.

**Limitações do teste de sensibilidade:**

A interpretação dos resultados segundo a tabela recomendada se aplica aos organismos de crescimento rápido. Organismos de crescimento lento requerem uma padronização à parte.

**Interpretar a sensibilidade bacteriana de acordo com o documento atualizado disponível no site [www.breast.org.br](http://www.breast.org.br): TABELA DE PONTES DE CORTE CLINICOS BrCAST**

**9.2- CONTROLE DE QUALIDADE**

Toda vez que receber um lote novo do disco de antibacteriano o laboratório pode realizar o teste qualitativo de controle de qualidade com cepas padrões ATCC nas condições do laboratório e interpretar os resultados usando a tabela de controle atualizadas do BrCAST e CLSI.

**10- Descrição das características de desempenho do produto.**

O método de Kirby Bauer usando os discos de antibióticos é perfeitamente reprodutível desde que a metodologia seja seguida corretamente.

**11- Referências bibliográficas:**

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing M100-S26:2016
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing;
- Bauer, A. W.; Kirby, W. M. M.; Sherris, J. C. and Turck, M – Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. Amer. J. Clin. Path. 45:493-6, 1966.
- Federal Register, vol. 37 n° 191, September 30, 1972.

- Ximenes, J. – Importância da padronização da prova de sensibilidade bacteriana (antibiograma). A Folha Médica vol. 66 nº 3, p. 113-116. 1973.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), “Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests”. M 100-S Vol. 6 nº 21, 1983.
- Code of Federal Regulations – 21 CFR ch 1 (4-1-85 Edition) Part 460- Antibiotic drugs intended for use in laboratory diagnosis of disease.1985.
- Farmacopéia Brasileira 4ª Ed. Vol. 1, Ayheneu, 1988.
- BrCAST Brazilian Committee on Antimicrobial Suscetibility Testing (EuCAST European Committee on Antimicrobial Suscetibility Testing) – Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de Halo
- CLSI M100: ED 31 (Clinical and Laboratory Standards Institute), Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing, 31<sup>st</sup> Edition MAR 2021.

Essa Instrução de uso segue MP- 01 Sensibiodisc CECON (Revisão 01 Ago 2014)

Atendimento ao consumidor / contato do usuário com o fornecedor  
CECON – Centro de Controle e Produtos Para Diagnósticos Ltda.  
Rua Maranguape, 84 – Cep 05625-150  
Fone: (011) 3743-6211 / Fax: (011) 3743-4394  
Vila Sonia – São Paulo – SP

Farmacêutica Responsável: Dra. Ana Paula Cotrim - CRF- SP nº 23.426.

Registro no M.S. nº 80564740018

Somente para uso diagnóstico “in vitro”

Fabricado e Distribuído por:  
CECON – Centro de Controle e Produtos para Diagnósticos Ltda.  
Rua Maranguape, 84 – Cep 05625-150 – Vila Sonia – São Paulo – SP  
Indústria Brasileira – CNPJ nº 46.273.637/0001-52  
Fone: (11) 3743-6211 / FAX: (11) 3743-4394  
e-mail: cecon@ceconsp.com.br

Nº do lote, fabricação e prazo de validade: vide frasco.