

## Finalidade:

Painel de microdiluição destinado à determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de Vancomicina para microrganismos gram-positivos.

**ANVISA n° MS:**  
10097010-176

**Apresentação:**  
640010 - CIM - VANCOMICINA - CX 10T

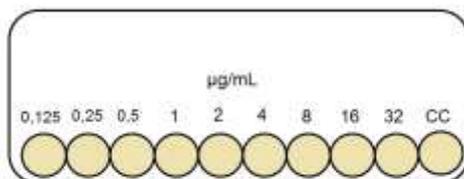
**LB 172303**  
**Rev. 02– 09/2024**

## 1. INTRODUÇÃO

A determinação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos por antibiograma é uma das principais atividades realizadas por laboratórios de microbiologia clínica, pois os resultados desses testes auxiliam na seleção da terapia antimicrobiana mais adequada. Para a determinação do perfil de sensibilidade várias metodologias estão disponíveis, no entanto, a microdiluição em caldo é considerada a técnica padrão-ouro, pois fornece resultados quantitativos (Concentração Inibitória Mínima - CIM). Por outro lado, técnicas qualitativas como o disco difusão, apesar de serem de fácil execução, não são capazes de predizer a CIM. Para o tratamento de infecções leves, a determinação da CIM nem sempre é necessária, entretanto, para o tratamento de infecções graves, principalmente as que acometem pacientes em unidades de terapia intensiva (UTIs), a determinação da CIM auxilia não somente na seleção da terapia antimicrobiana, como também orienta o esquema posológico mais adequado. A determinação da CIM também é necessária para microrganismos ou combinações de microrganismos e antimicrobianos em que o teste de disco difusão não é confiável, como por exemplo, para glicopeptídeos e *Staphylococcus aureus*. Dessa maneira, metodologias de fácil execução que forneçam a CIM com acurácia são altamente desejáveis na microbiologia clínica.

## 2. COMPOSIÇÃO

Painel em poliestireno com 10 cavidades e tampa, contendo meio de cultivo liofilizado, de coloração amarelo âmbar composto por Mueller Hinton cátions ajustados. A cavidade identificada como CC (Controle de Crescimento) não contém antimicrobiano. As demais cavidades contêm diferentes concentrações de Vancomicina, conforme indicado na figura abaixo.



## 3. AMOSTRAS

### a- Tipos de amostras

- Colônias isoladas, com mesmo tipo morfológico, com crescimento em torno de 24 horas de incubação, isoladas de meios não seletivos, como agar Sangue, agar Chocolate, agar Cled, entre outros;

- Não utilizar culturas contaminadas ou que apresentem crescimento de mais de uma espécie no cultivo primário e que não possam ser separadas visualmente.

## 4. INFORMAÇÕES GERAIS SOBRE O PRODUTO

### a- Princípio

O método de microdiluição em caldo é considerado o padrão ouro na determinação da CIM, utilizado para determinar quantitativamente a menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir o crescimento *in vitro* de um microrganismo. Após a diluição

do antimicrobiano no caldo, uma suspensão bacteriana padronizada é inoculada e incubada.

A leitura é realizada contra a luz, pela observação de precipitado de bactérias no fundo da cavidade e/ou da turvação do meio.

### b- Armazenamento e estabilidade

Para fins de transporte, o produto deve permanecer na presença de gelo. No laboratório o produto deve ser armazenado sob refrigeração (entre 2 a 8°C). Nestas condições o produto permanece estável quanto ao desempenho até a data de vencimento expressa em rótulo, desde que isento de contaminação de qualquer natureza.

### c- Precauções e cuidados especiais

- O produto destinado apenas para o uso diagnóstico *in vitro*;
- Uso restrito por profissionais;
- Mesmo se tratando de produto livre de agentes infecciosos, recomenda-se tratar este produto como potencialmente infeccioso, observando o uso de equipamentos de proteção individual e coletivo;
- Não inalar ou ingerir;
- Não utilizar painéis com sinais de contaminação, umidade ou com alterações de cor no meio;
- Não usar materiais com o prazo de validade expirado, ou que apresentem selo de qualidade rompido ou violado;
- Recomenda-se a leitura da diretriz aprovada para "Proteção de Trabalhadores de Laboratório e Infecções Obtidas no Trabalho - CLSI® M29-A" para o manuseio seguro;
- O procedimento de descarte do produto se baseia na RDC 222 (ANVISA) de 28 de março de 2018, que regulamenta as boas práticas de gerenciamento dos resíduos de serviços de saúde;
- Para acondicionamento do material a ser autoclavado, recomendamos o uso dos sacos para autoclavação – Detrilab;
- Contate o serviço de vigilância sanitária de sua região para garantir o cumprimento correto da legislação de descarte de produtos potencialmente contaminantes.

## 5. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS (porém não fornecidos)

- Agulha ou alça bacteriológica;
- Bico de Bunsen;
- Estufa bacteriológica;
- Solução salina estéril (0,85%) ou água estéril;
- Tubo contendo padrão 0,5 da escala Mac Farland;
- Tubos estéreis;
- Micropipetas e ponteiras estéreis.

## 6. PROCEDIMENTO TÉCNICO

- Retirar da caixa somente a quantidade de painéis a serem utilizados.
- Utilizar o painel e a água estéril em temperatura ambiente (~24°C) no momento do uso.

### a- Preparo do inóculo

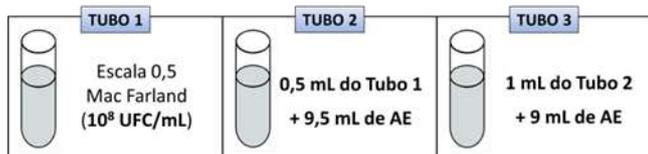
- Com auxílio de agulha ou alça bacteriológica estéril, encostar na superfície da colônia pura e suspendendo-a em água ou solução salina estéril de maneira a se obter uma turvação equivalente ao Tubo 0,5 da Escala Mac Farland (equivalente a  $1 \times 10^8$  UFC/mL).  
Identificar como Tubo 1.

- A partir do Tubo 1, fazer diluição de 1:20 (vinte vezes) em água ou solução salina estéril, para obter suspensão com concentração final de  $5 \times 10^6$  UFC/mL. Identificar como Tubo 2.

- A partir do Tubo 2, fazer diluição de 1:10 (dez vezes) em água ou solução salina estéril e identificar como Tubo 3.

- O Tubo 3 terá concentração final de  $5 \times 10^5$  UFC/mL. Utilizar a suspensão do Tubo 3 para fazer o teste.

- Seguir o esquema de diluição bacteriana abaixo:



AE: água ou solução salina estéril

#### b- Inoculação das placas

- Após atingir temperatura ambiente, retirar assepticamente o painel da embalagem;

- Preferencialmente dentro de 15 minutos após o preparo do inóculo, com auxílio de uma micropipeta com a ponteira estéril, transferir 100  $\mu$ L da suspensão do Tubo 3 para cada cavidade do painel;

**OBS:** Dispensar primeiro o volume na cavidade CC e em seguida preencher as outras cavidades, da menor para a maior concentração para evitar contaminação do antimicrobiano;

- Tampar o painel, identificar e incubar em câmara úmida na temperatura de 35°C, por 18 $\pm$ 2 horas, em ar ambiente, ou conforme padronização da técnica utilizada;

**OBS:** Não incubar mais que quatro painéis empilhados, para que a temperatura de incubação seja mantida em todos os poços.

- Retirar da estufa e realizar a leitura.

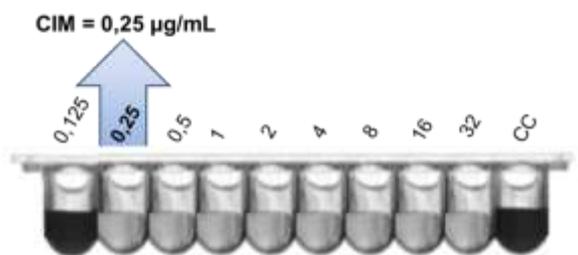
## 7. RESULTADOS

- A interpretação deve ser realizada pela observação do painel contra a luz.

- O crescimento bacteriano é representado pela turvação do caldo ou pela presença de precipitado na cavidade do painel.

- O crescimento bacteriano na cavidade CC valida o teste. Caso não haja crescimento bacteriano na cavidade CC, o teste será considerado inválido, devendo ser realizado novamente com um novo painel.

- A CIM é indicada pela primeira cavidade com ausência de crescimento bacteriano. Por exemplo, o teste apresentou crescimento apenas nas cavidades CC e 0,125  $\mu$ g/mL, a CIM desde teste é de 0,25  $\mu$ g/mL para Vancomicina.



Interpretação do resultado: CIM = 0,25  $\mu$ g/mL.

Na ausência de crescimento em todas as concentrações, exceto o poço CC, o teste deverá ser interpretado como  $\leq 0,125$   $\mu$ g/mL, assim como na ocorrência de crescimento bacteriano em todos os poços o teste deverá ser interpretado como  $> 32,0$   $\mu$ g/mL.

Caso ocorra a formação de poços alternados (ausência de crescimento em um poço cuja concentração superior haja

desenvolvimento bacteriano) o teste deverá ser considerado inválido.

O resultado é liberado em  $\mu$ g/mL e comparado com os documentos e tabelas disponibilizados pelos comitês de padronização (CLSI, BRcast/EUCAST).

## 8. LIMITAÇÕES DO MÉTODO

(Riscos Residuais Identificados conforme RDC 830/2023)

- Os resultados falso-negativos podem ocorrer com maior frequência nas seguintes situações:

- Incubação em temperatura inadequada;
- Utilização de alça flambada não resfriada;
- Tempo e temperatura de incubação insuficiente;
- Armazenamento ou transporte inadequado do produto;
- Agentes etiológicos exigentes com relação aos meios de cultura;
- Interpretação equivocada do crescimento bacteriano.

- Os resultados falso-positivos podem ocorrer, com maior frequência, nas seguintes situações:

- Técnica de assepsia inadequada;
- Erro na conservação do material;
- Tempo longo entre a coleta e a análise;
- Tempo excessivo de incubação;
- Interpretação equivocada do crescimento bacteriano;
- Utilização de material vencido, contaminado ou em condições inadequadas;
- Contaminação cruzada por uso de acessórios não esterilizados corretamente ou ambiente não asséptico.

## 9. CONTROLE DA QUALIDADE

- *Materiais necessários*

Cepas padrão: ATCC® (*American Type Culture Collection*) ou derivadas.

Cepa	Resultado esperado
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 29213	0,5 - 2 $\mu$ g/mL
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 29212	1 - 4 $\mu$ g/mL

## 10. GARANTIA DA QUALIDADE

A Laborclin obedece ao disposto na Lei 8.078/90 - Código de Defesa do Consumidor. Para que o produto apresente seu melhor desempenho, é necessário que:

- O usuário conheça e siga rigorosamente o presente procedimento técnico;
- Os materiais estejam sendo armazenados em condições adequadas;
- Os equipamentos e demais acessórios necessários estejam em boas condições de uso, manutenção e limpeza;
- Antes de ser liberado para venda, cada lote do produto é submetido a testes específicos, que são repetidos periodicamente até a data de vencimento expressa em rótulo;
- Os certificados de análise de cada lote podem ser obtidos no site [www.laborclin.com.br](http://www.laborclin.com.br);
- Em caso de dúvidas ou quaisquer problemas de origem técnica, contatar o SAC - Serviço de Assessoria ao Cliente através do telefone 0800-0410027;
- Quaisquer problemas que inviabilizem uma boa resposta do produto, que tenham ocorrido comprovadamente por falha da Laborclin serão resolvidos sem ônus para o cliente.

## 11. REFERÊNCIAS

1. Baker, C.N.; Thomsberry, C.; and Hawkinson, R.W. 1983. Inoculum standardization in antimicrobial susceptibility testing: evaluation of overnight agar cultures and the rapid inoculum standardization system. *J. Clin. Microbiol.* 17:450-457.
2. Barry, A.L.; Garcia, F.; and Thrupp, L.D. 1970. An improved single-disk method for testing the antibiotic susceptibility of rapidly-growing pathogens. *Am. J. Clin. Pathol.* 53:149-158.

3. CLSI. Approved standard: M02-A12 - Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. CLSI, Wayne, PA, USA. Search for latest version at [www.clsi.org](http://www.clsi.org).
4. CLSI - Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. Search for latest version at [www.clsi.org](http://www.clsi.org).
5. CLSI - Approved standard: M7. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. CLSI, Wayne, PA, USA. Search for latest version at [www.clsi.org](http://www.clsi.org).
6. D'Amato, R.F. and Thornsberry, L.D. 1979. Calcium and magnesium in Mueller-Hinton agar and their influence on disk diffusion susceptibility results. *Current Microbiol.* 2:135-138.
7. Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing. Search for latest version at <http://www.eucast.org>.
8. ISO: Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test-devices – Part 1: Broth micro-dilution reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. ISO 20776-1:2019(E).
9. Johnson, J.E. and Washington J.A II. 1976. Comparison of direct and standardized antimicrobial susceptibility testing of positive blood cultures. *Antimicrob. Agents Chemother.* 10:211-214.
10. Kavanagh, A.; Ramu, S.; Gong, Y.; Gong, M.A. and Blaskovich, M.A.T. Effects of microplate type and broth additives on microdilution MIC susceptibility assays. *Antimicrob Agents Chemother* 63:e01760-2018.
11. Koneman, E. W. Diagnóstico microbiológico. Guanabara Koogan 6ed., 2010.
12. Matuschek, E., D.F. Brown, and G. Kahlmeter. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014; 20(4): 255-66.
13. Murray, B.E. 1990. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 3:46-65.
14. Mueller, J.H., and Hinton J. 1941. A protein-free medium for primary isolation of the *Gonococcus* and *Meningococcus*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 48:330-333.
15. Oplustil, C.P.; Zoccoli, C.M.; Tobouti, N.R. e Scheffer, M.C. Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica. 4.ed. Sarvier, São Paulo, 2020.
16. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Search for latest version at <http://www.eucast.org>.
17. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. Search for latest version at <http://www.eucast.org>.
18. Vaudaux, P.; Huggler, E.; Bernard, L.; Ferry, T.; Renzoni, A., and Lew, D.P. 2010. Underestimation of vancomycin and teicoplanin MICs by broth microdilution leads to underdetection of glycopeptide-intermediate isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(9):3861-3870.
19. Washington, J.A. and Woods, G.L. 1995. Antimicrobial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. P. 1327-1341. In Muarry, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C., and Tenover, R.H. (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1995.
20. Waterworth, P.M. and Del Piano, M. 1976. Dependability of sensitivity tests in primary culture. *J. Clin. Pathol.* 29:179-184.



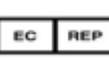
**Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda**

CNPJ 76.619.113/0001-31  
Insc. Estadual 1370012926  
Rua Casimiro de Abreu, 521  
Pinhais/PR CEP 83.321-210  
Telefone (41) 36619000  
[www.laborclin.com.br](http://www.laborclin.com.br)

**Responsável Técnico:**

Maire Wakamori – CRF-PR 20176  
Serviço de Assessoria ao Cliente  
SAC 0800-0410027  
[sac@laborclin.com.br](mailto:sac@laborclin.com.br)

ANEXO 1 – LISTA DE SÍMBOLOS UTILIZADOS NOS RÓTULOS

	Código do produto		Número de lote
	Número de série		Fabricante
	Consultar instruções para utilização		Validade
	Temperatura de armazenagem (limite de temperatura)		Produto para saúde para diagnóstico <i>in vitro</i> .
	Não utilizar se a embalagem estiver danificada		Representante autorizado na Comunidade Européia
	Quantidade suficiente para <n> ensaios		Frágil, manusear com cuidado
	Esterilizado utilizando técnicas assépticas de processamento		Esterilização utilizando óxido de etileno
	Esterilização utilizando irradiação		Esterilizado utilizando vapor ou calor seco.
	Risco biológico		Cuidado. Importante consultar instruções de uso.
	Controle		Controle Negativo
	Controle Positivo		Manter seco
	Manter afastado da luz solar e longe do calor		Somente para avaliação de desempenho
	Não utilizar		Não reesterilizar

Fonte: ABNT NBR ISO 15223-1 – Terceira edição (24.08.2022)