



Concurso Público Fiocruz 2023

Tecnologista em Saúde Pública

Prova Discursiva

TE84

Bacteriologia e Biologia Molecular de Micobactérias

Espelho de Resposta

Pontuação da Questão Discursiva conforme Anexo II do Edital nº 2, de acordo com a Unidade detentora da vaga.

Espera-se que o candidato discorra sobre os métodos fenotípicos padronizados pelo CLSI para teste de sensibilidade do complexo *Mycobacterium avium*, considerando os seguintes itens de a até j:

Para os testes de sensibilidade de espécies do complexo *M. avium* devem ser utilizados os documentos vigentes do M24 e M24S do CLSI, até que o BrCAST publique normas para teste de sensibilidade dessas espécies.

Os antimicrobianos de primeira linha a serem testados são amicacina e claritromicina, pois há, na literatura científica indexada, evidência de correlação adequada entre os testes de sensibilidade *in vitro* e resposta clínica. O resultado obtido para claritromicina pode ser extrapolado para azitromicina, pois as mutações observadas no rRNA 23S em isolados resistentes à Claritromicina são as mesmas observadas nos isolados resistentes à azitromicina.

Caso o paciente não possa utilizar claritromicina ou azitromicina, ou haja resistência à claritromicina, podem ser testados o moxifloxacino e a linezolida.

A clofazimina também pode ser testada no caso de resistência à claritromicina, mas a CIM deve ser liberada sem categoria. Esses três antimicrobianos são considerados de segunda linha.

Apesar de etambutol, rifampicina e rifabutina serem utilizados no tratamento, a correlação entre concentração inibitória mínima e resposta clínica é baixa. Por esse motivo esses antimicrobianos não devem ser testados ou reportados para as espécies do complexo *M. avium*.

Os sais de antimicrobianos devem vir acompanhados de certificado de qualidade que indique pureza, fração ativa e conteúdo de água. A potência deve ser calculada com a fórmula: $\text{Potência} = \text{Pureza} \times \text{Fração ativa} \times (1 - \text{conteúdo de água})$. A pureza pode ser expressa em µg/mg ou %.

Para calcular a quantidade do sal a ser pesado para preparo de 45 mL de solução 10.000 µg/mL deve ser utilizada a fórmula:

$$\text{Quantidade a ser pesada (mg)} = \frac{45 \text{ mL} \times 10.000 \text{ } \mu\text{g/mL}}{900 \text{ } \mu\text{g/mg}} = 50 \text{ mg}$$

A água grau reagente é o solvente e o diluente a serem utilizados para as soluções de amicacina e moxifloxacino. Para claritromicina o solvente é o metanol ou alternativamente ácido acético glacial. Nesse caso deve ser adicionado metade do volume de água e a seguir o ácido acético gota a gota com agitação constante até um máximo de 2,5 $\mu\text{L/mL}$. O diluente deve ser tampão fosfato 0,1M pH 6,5.

As soluções devem ser divididas em alíquotas identificadas e estocadas em freezer em temperatura $\leq -60^{\circ}\text{C}$ por 6 a 12 meses.

As concentrações testadas devem abranger os valores esperados para as cepas de controle de qualidade e os pontos de corte de sensibilidade e resistência. Além disso, pelo menos uma diluição acima e uma diluição abaixo dos valores máximo e mínimo de valores esperados e pontos de corte.

O meio a ser utilizado é o caldo Mueller-Hinton cátion-ajustado com 5% de OADC.

O procedimento deve ser executado em cabine de segurança biológica. Para preparo dos painéis de microdiluição, deve ser utilizada placa estéril de 96 poços com fundo em U com tampa. Utilizando ponteiras estéreis de 200 μL com filtro, e pipeta automática calibrada de 8 canais, preencher os poços das colunas 2 a 12 com 50 μL de caldo Mueller-Hinton com 5% de OADC.

Preencher cada poço da coluna 1 de uma linha com solução de antimicrobiano diferente (1 antimicrobiano por linha), com o dobro da concentração final desejada, todos em caldo Mueller-Hinton com OADC (CMHCA-OADC). Utilizando pipeta de 8 canais e ponteiras estéreis, transferir 50 μL de solução para o próximo poço da mesma linha, homogeneizar por 3 a 5 vezes, aspirar transferir 50 μL de solução para o próximo poço da mesma linha e assim sucessivamente até a coluna 10, onde após homogeneização o volume de 50 μL deve ser descartado. Os poços da coluna 11 serão utilizados para controle de crescimento e os da coluna 12 para controle de esterilidade.

Deve ser preparado um mapa com a posição dos antimicrobianos e concentração em cada poço, campo para data de preparo, data de leitura, espécie, identificação e registro do paciente.

Preparar suspensão bacteriana a partir cultura pura, recente, idealmente em meio sólido, pois um aspecto importante é que o inóculo deve ser preparado a partir de colônias transparentes, caso presentes.

Transferir as colônias para tubo estéril contendo água, grau reagente e pérolas de vidro de 3 mm. Ajustar a turbidez da suspensão utilizando densitômetro, para MF 0,5. Caso haja grumos, deixar decantar e reajustar a suspensão sem grumos para o padrão MF 0,5.

Transferir 100 μL da suspensão para tubo contendo 10 mL de CMHCA-OADC. Homogeneizar por inversão por 8 a 10 vezes.

Transferir para placa de Petri estéril ou reservatório para pipetagem estéril.

Pipetar, da coluna 12 para a coluna 1, 50 μL da suspensão diluída, tocando a parede interna, mas não a solução de antimicrobiano.

Aplicar filme adesivo para lacrar a placa.

Semear placas de 7H10 e ágar sangue de carneiro com 10 µL de suspensão bacteriana, que servirão como controle de pureza.

Incubar em ar ambiente, a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$. Na estufa não empilhar mais do que 3 placas, visando garantir homogeneidade da temperatura.

As placas devem ser observadas após 7 dias de incubação. Caso o crescimento seja insuficiente, reincubar até 14 dias.

O crescimento bacteriano é evidenciado pela presença de um pequeno botão branco no fundo do poço.

A coluna 12 de teste de esterilidade deve estar sem crescimento. A coluna 11 deve apresentar crescimento em todos os poços.

A concentração inibitória mínima é a menor concentração de antimicrobiano capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano.

Interpretar, segundo a tabela de pontos de corte para MAC que consta no documento M24S.

A cada lote de testes deve ser testada em paralelo a cepa de controle de qualidade *M. avium* ATCC700898 ou *M. marinum* ATCC927. Os resultados dos pacientes só poderão ser liberados se os valores obtidos para a cepa de referência estiverem dentro dos limites preconizados no documento M24S.

Além do valor dentro da faixa aceitável, o ideal é que na análise cumulativa a média das CIMs esteja no centro da faixa de referência. Valores médios no limite inferior sistematicamente podem indicar excesso de antimicrobiano ou densidade do inóculo abaixo da recomendada, enquanto valores no limite superior podem indicar perda da potência do antimicrobiano, ou densidade do inóculo acima da recomendada.

Ao reportar o laudo, a concentração inibitória para amicacina deve ser interpretada de duas formas: amicacina intravenosa e amicacina inalável, pois são considerados sensíveis isolados com CIM 16 mg/L para a forma intravenosa e sensíveis isolados com CIM 64 mg/L para amicacina inalável.