

ARTIGO ORIGINAL

É possível ler o antibiograma de bactérias obtidas de infecção urinária em 6 horas utilizando os novos pontos de corte propostos pelo EUCAST?

Is it possible to read the antibiogram of bacteria obtained from urinary tract infection in 6 hours using the new cutoff points proposed by EUCAST?

¿Es posible leer el antibiograma de bacterias obtenidas de la infección del tracto urinario en 6 horas usando los nuevos puntos de corte propuestos por EUCAST?

Nathalia Feltes,¹ Afonso Luís Barth.^{1,2}

¹LABRESIS – Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Curso de Especialização em Análises Clínicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Recebido em: 30/01/2020

Aceito em: 09/02/2020

Disponível online: 09/02/2020

Autor correspondente:

Afonso Luís Barth

albarth@hcpa.edu.br

RESUMO

Justificativa e objetivos: A *Escherichia coli*, pertencente à família *Enterobacteriaceae* ordem *Enterobacterales*, é o principal patógeno da infecção do trato urinário (ITU) correspondendo a cerca de 80% de todas as ITUs. A crescente resistência antimicrobiana e a rápida liberação do antibiograma são desafios para microbiologistas e profissionais da saúde. Este estudo teve como objetivo avaliar a liberação do perfil de sensibilidade de *E. coli* do trato urinário em até 24-30 horas do recebimento da amostra. **Métodos:** Foi realizada uma análise comparativa do diâmetro dos halos de inibição de antibiogramas por disco-difusão em leituras de 6 e 18 horas de incubação utilizando os novos pontos de corte propostos pelo EUCAST para hemoculturas (RAST) e os pontos de corte padrão em leituras de 6 e 18 horas (padrão). **Resultados:** Embora tenha havido uma tendência de aumento do tamanho do halo para a maioria dos antibióticos com o maior tempo de incubação, esse aumento normalmente não foi significativo sendo que as leituras em 6h e 18h (padrão) apresentaram ótimos percentuais de concordância para os antimicrobianos testados. **Discussão:** Os pontos de corte padrão utilizados em leituras em 6h seriam

mais indicados que os pontos de corte de leitura rápida “RAST” porque incluem mais opções de antibióticos para tratamento de infecção urinária. Os pontos de corte “RAST” padronizados pelo EUCAST devem ter maior valor para leitura de hemocultura, como o próprio documento indica.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, Infecções urinárias, RAST, EUCAST

ABSTRACT

Background and Objectives: *Escherichia coli*, belonging to the family *Enterobacteriaceae* order *Enterobacterales*, is the main pathogen for urinary tract infection (UTI) accounting for about 80% of all UTIs. The increasing antimicrobial resistance and the rapid release of the antibiogram are challenges for microbiologists and health professionals. The purpose of this study was to analyze the release of sensitivity profile of *E. coli* of the urinary tract within 24-30 hours of receiving the sample. **Methods:** A comparative analysis of the diameter of the disc-diffusion antibiogram inhibition halos in the 6 and 18 hour incubation readings using the new cut-off points proposed

by the EUCAST for blood cultures (RAST) and the standard cut-off points in the readings of 6 and 18 hours (standard). **Results:** Although there was a tendency of increasing halo size for most antibiotics with the longest incubation time, this increase was not usually significant and the 6h and 18h (standard) readings showed a good percentage of agreement for the tested antimicrobials. **Discussion:** The standard cut-off points used for 6-h readings would be more indicated than "RAST" fast cut-offs because they include more antibiotic options for treating urinary tract infection. The "RAST" cut-off points standardized by EUCAST should have a higher value for blood culture reading, as the document itself indicates.

Key words: *Escherichia coli*, ITU, RAST, EUCAST.

RESUMEN

Antecedentes y objetivos: *Escherichia coli*, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, orden *Enterobacterales*, es el principal patógeno de la infección del tracto urinario (ITU) que corresponde a aproximadamente el 80% de todas las ITU. La creciente resistencia a los antimicrobianos y la rápida liberación del antibiograma son desafíos para los microbiólogos y los profesionales de la salud. Este estudio tuvo como objetivo evaluar la liberación del perfil de sensibilidad de *E. coli* del tracto urinario dentro de las 24-30 horas posteriores a la recepción de la muestra. **Métodos:** Se realizó un análisis comparativo del diámetro de los halos de inhibición de antibióticos por difusión en disco en lecturas de 6 y 18 horas de incubación utilizando los nuevos puntos de corte propuestos por EUCAST para hemocultivos (RAST) y los puntos de corte estándar en las lecturas 6 y 18 horas (estándar). **Resultados:** Aunque hubo una tendencia a aumentar el tamaño del halo para la mayoría de los antibióticos con el mayor tiempo de incubación, este aumento generalmente no fue significativo y las lecturas en 6 y 18 horas (estándar) mostraron excelentes porcentajes de acuerdo para los antimicrobianos probados. **Discusión:** Los puntos de corte estándar utilizados en las lecturas de 6 horas serían más adecuados que los puntos de corte de lectura rápida "RAST" porque incluyen más opciones de antibióticos para tratar infecciones del tracto urinario. Los puntos de corte "RAST" estandarizados por EUCAST deben tener un valor más alto para la lectura de hemocultivos, como muestra el documento.

Palabras clave: *Escherichia coli*, infecciones urinarias, RAST, EUCAST.

INTRODUÇÃO

A infecção do trato urinário (ITU) é uma doença infecciosa frequentemente diagnosticada em clínicas e hospitais do mundo inteiro, sendo mais comum em mulheres do que em homens.^{1,2} A *Escherichia coli*, pertencente à família *Enterobacteriaceae* ordem *Enterobacterales*, é o principal patógeno, correspondendo a cerca de 80% de todas ITU.^{3,4}

A maioria das ITUs é tratada de forma empírica, visto que, para liberação do resultado do exame bacteriológico e do perfil de sensibilidade com as técnicas padrões, o laboratório necessita de, pelo menos, 48 horas.⁵⁻⁷ A demora na liberação do antibiograma, juntamente com o aumento da resistência bacteriana, leva a uma resposta imprevisível ao tratamento e crescente uso de antimicrobianos de amplo espectro.⁷⁻⁸ Desta forma, a rápida disponibilidade do resultado do antibiograma é muito importante para diminuir as eventuais falhas terapêuticas no tratamento empírico com antimicrobianos.⁶

Recentemente, o Comitê Europeu de Teste de Suscetibilidade (EUCAST 2019) publicou recomendações de pontos de corte para leitura após incubação curta (4, 6 e 8h) do antibiograma realizado diretamente de frascos de hemocultura positivos (RAST, *rapid antimicrobial susceptibility testing*). Esta padronização está indicada para a técnica de disco-difusão, para alguns antimicrobianos e para algumas bactérias específicas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pneumoniae*), utilizando inóculos de 100-150uL sem centrifugação ou diluição. Após curta incubação, as zonas de inibição devem ser lidas com uso de luz refletida. Os pontos de corte do diâmetro dos halos de inibição para interpretação dos resultados em "Sensível", "Área de incerteza técnica" e "Resistente" são específicos para cada tempo de incubação e espécie.⁹ A identificação bacteriana rápida, a qual pode ser realizada pela tecnologia de espectrometria de massas (técnica de MALDI-TOF), é pré-requisito para correta utilização destes pontos de corte.¹⁰

O objetivo desse estudo foi fazer uma análise comparativa do diâmetro dos halos de inibição de antibiogramas por disco-difusão em leituras em 6 e 18 horas de incubação, a fim de avaliar a liberação do antibiograma de uroculturas em, no máximo, 24 a 30 horas após o recebimento da amostra no laboratório.

MÉTODOS

Isolados de *Escherichia coli* provenientes de amostras de urina de um laboratório da região do Vale dos Sinos, Rio Grande do Sul, Brasil, que presta atendimento hospitalar e à comunidade foram utilizados nesse estudo. As urinas foram semeadas em ágar cromogênico (Laborclin ou Biomerieux) usando alças bacteriológicas de 1µl para quantificação. As placas foram incubadas a 35 ± 1°C por 16-24 horas. Inicialmente foram selecionados 213 isolados (Grupo A) de *E.coli* com contagem ≥10⁵ UFC/mL para realização do teste de sensibilidade de acordo com a metodologia de disco-difusão conforme o EUCAST.¹¹⁻¹² Os discos de antimicrobianos (Bio-Rad) testados foram os que apresentam pontos de corte para leitura rápida e que estavam disponíveis no laboratório, na mesma concentração: gentamicina 10 µg, amicacina 30 µg, meropenem 10 µg e ciprofloxacino 5 µg. Posteriormente, foram avaliados 150 isolados de *E.coli* (≥10⁵ UFC/mL) para um segundo grupo (Grupo B) com antimicrobianos utilizados contra a infecção urinária que não apresentam pontos de corte para RAST: ampicilina 10 µg, amoxicilina-ácido clavulânico 20-10 µg, norfloxacino 10 µg, sulfametoxazol-trimetoprima 23,75-1,25 µg e, novamente, ciprofloxacino 5 µg.

O ágar Mueller-Hinton cátions ajustado (Laborclin) foi incubado a 35 ± 1°C em ar ambiente por 6 horas para a leitura rápida e após re-incubado até 18 horas para leitura padrão. A leitura dos halos de inibição foi realizada com régua contra um fundo escuro. Para interpretação de categoria, utilizou-se os novos pontos de corte para hemocultura propostos pelo EUCAST em 2019, aplicados para a leitura de antibiograma de isolados de *Escherichia coli* do trato urinário (denominados rAST-U), em comparação com a leitura padrão em 18 horas (AST-18h) e a avaliação dos pontos de corte padrão em leitura de 6 (AST-6h), comparados a de 18 horas (AST-18h).

Para o Grupo A, foi realizada a leitura com os pontos de corte RAST (rAST-U), padrão (AST-18h) e leitura padrão mais rápida (AST-6h). Para o grupo B, foi realizada a leitura padrão em 6 e 18 horas (AST-6h e AST-18h). A leitura tradicional, 18 horas, foi utilizada como controle/padrão (Tabela 1).

Tabela 1. Pontos de corte para leitura rápida (RAST) e padrão.

	Pontos de corte RAST			Pontos de corte Padrão			
	S (≥)	AIT	R (<)	S (≥)	I	R (<)	AIT
GN	14	12-13	12	17	14-16	14	-
AN	15	13-14	13	18	15-17	15	-
MEM	17	15-16	15	22	16-21	16	-
CIP	20	17-19	17	25	22-24	22	22-24
AMP	-	-	-	14	-	14	-
AMC	-	-	-	19	-	19	19-20
NOR	-	-	-	22	19-21	19	-
SXT	-	-	-	14	11-13	11	-

GN, Gentamicina; AN, Amicacina; MEM, Meropenem; CIP, Ciprofloxacino; AMP, Ampicilina; AMC, Amoxicilina-ácido clavulânico; NOR, Nofloxacino; SXT, Sulfametoxazol-trimetoprima.

Para cada isolado bacteriano e antibiótico foi realizado um comparativo de diâmetro e interpretação de categoria entre a leitura rápida (6h) e a padrão (18h): Sensível (S), Sensível, aumentando a exposição (I), Área de Incerteza Técnica (AIT) e Resistente (R). Isolados classificados como “AIT” na leitura de 6 horas foram excluídos do estudo.

As divergências de categoria foram classificadas como *very major error* (VME), *major error* (ME) e *minor error* (mE) conforme segue: VME, se “S” no método teste (rAST-U ou AST-6h) e “R” no método padrão (AST-18h); ME, se “R” no método teste (rAST-U ou AST-6h) e “S” no método padrão (AST-18h); e mE, se “I” no método teste (rAST-U ou AST-6h) e “S” ou “R” no método padrão (AST-18h), ou vice-versa. Isolados categorizados como “AIT” na leitura de 18 horas não foram classificados como erro nem como concordância de categoria (tabela 4 e 5). Diferenças de até dois mm nas medidas dos halos de inibição foram interpretadas como erro inerente da técnica e desconsiderados.

RESULTADOS

Para o grupo A, crescimento visível para a leitura rá-

pida (6h) foi obtido com apenas 200 (93,9%) de 213 isolados. Para amicacina (AN), 96,5% dos halos não modificaram mais que dois milímetros (mm) na comparação entre a leitura de 6 (rAST-U) e de 18 horas (AST-18h). Resultado semelhante foi visto com gentamicina (GN) (94% de concordância). Já para meropenem (MEM) e ciprofloxacino (CIP) houve uma menor concordância, ou seja, 82% e 80,5%, respectivamente (Tabela 2). Para todos os discos de antimicrobianos houve tendência de aumento de halo com aumento de tempo de incubação (6h versus 18h), embora, na maioria das vezes, este aumento tenha sido considerado erro inerente da técnica (≤ 2 mm).

Para o grupo B, o crescimento foi suficiente para a leitura rápida (6h) em 147 de 150 (98%) isolados. Na comparação AST-6h e AST-18h, amoxicilina-ácido clavulânico (AMC), apresentou 96,7% de concordância de halo, seguido de ampicilina (AMP) com 95,2% e sulfametoxazol-trimetoprima (SXT) com 90,5%. Já as fluoroquinolonas norfloxacino (NOR) e ciprofloxacino (CIP), apresentaram concordância menor que 70%. Os antimicrobianos AMP e SXT apresentaram maior percentual de resistência com ausência de halo. Para este grupo também houve tendência de aumento de halo com o aumento do tempo de incubação (6h versus 18h), mesmo que este aumento tenha sido considerado erro inerente da técnica (≤ 2 mm). (Tabela 3)

No primeiro comparativo do Grupo A, rAST-U versus AST-18h, houve 100% de concordância para meropenem e gentamicina, 98,5% para amicacina e 98% para ciprofloxacino. No total, foram encontrados três mE para amicacina e quatro AIT, em leitura de 18 horas, para ciprofloxacino. No segundo comparativo do Grupo A, AST-6h versus AST-18h, a concordância de categoria foi de 100% para meropenem e gentamicina, 99,5% para amicacina e 97,5% para ciprofloxacino, totalizando um mE para amicacina, três ME e dois AIT para ciprofloxacino (Tabela 4).

No comparativo do Grupo B (Tabela 5), AST-6h versus AST-18h, obteve-se 99,3% de concordância de categoria para AMP e AMC, seguido de 97,9% para SXT e NOR, e 95,8% para CIP. No total, foram encontrados 3 mE (dois para NOR e um para SXT), quatro ME (um AMP, um AMC, um NOR e um CIP) e dois VME (dois SXT).

Tabela 2. Análise de variação de halo entre as leituras de 6 e 18 horas para o Grupo A.

Antimicrobiano	Halo igual ou sem diferença significativa	Aumento do halo ≥ 3 mm	Diminuição do halo ≤ 3 mm
GN	188 (94%)	12 (6%)	0
AN	193 (96,5%)	7 (3,5%)	0
MEM	164 (82%)	35 (17,5%)	1 (0,5%)
CIP	161 (80,5%)	26 (19,5%)	0

GN, Gentamicina; AN, Amicacina; MEM, Meropenem; CIP, Ciprofloxacino.

Tabela 3. Análise de variação de halo entre as leituras de 6 e 18 horas para o Grupo B.

Antimicrobiano	Halo igual ou sem diferença significativa	Aumento do halo ≥ 3 mm	Diminuição do halo ≤ 3 mm
AMP	140 (95,2%)	7 (4,8%)	0
AMC	142 (96,7%)	4 (2,7%)	1 (0,6%)
NOR	104 (70,7%)	43 (29,3%)	0
CIP	93 (63,3%)	54 (36,7%)	0
SXT	133 (90,5%)	9 (6,1%)	5 (3,4%)

AMP, Ampicilina; AMC, Amoxicilina-ácido clavulânico; NOR, Nofloxacino; CIP, Ciprofloxacino; SXT, Sulfametoxazol-trimetoprima.

Tabela 4. Análise de discrepâncias, encontradas na comparação entre a leitura rápida e a leitura padrão para o Grupo A.

Antimicrobiano	mE n(%)	ME n(%)	VME n(%)	AIT* n(%)	Concordância n(%)	Total (n)
rAST-U versus AST-18h						
GN	0	0	0	0	197 (100)	197
NA	3 (1,5)	0	0	0	197 (98,5)	200
MEM	0	0	0	0	200 (100)	200
CIP	0	0	0	4 (2%)	195 (98)	199
AST-6h versus AST-18h						
GN	0	0	0	0	200 (100)	200
NA	1 (0,5)	0	0	0	199 (99,5)	200
MEM	0	0	0	0	200 (100)	200
CIP	0	3 (1,5)	0	2 (1%)	191 (97,5)	196

mE, minor error; ME, major error; VME, very major error.

*Isolados categorizados como "AIT" na leitura de 18 horas não foram classificados como erro.

GN, Gentamicina; AN, Amicacina; MEM, Meropenem; CIP, Ciprofloxacino.

Tabela 5. Análise de discrepâncias encontradas na comparação entre a leitura rápida e a leitura padrão para o Grupo B (AST-6h versus AST-18h).

Antimicrobiano	mE n(%)	ME n(%)	VME n(%)	AIT* n(%)	Concordância n(%)	Total (n)
AMP	0	1 (0,68%)	0	-	146 (99,32)	147
AMC	0	1 (0,69%)	0	0	144 (99,31)	145
NOR	2 (1,36)	1 (0,68%)	0	-	144 (97,96)	147
CIP	0	1 (0,69%)	0	5 (3,49)	137 (95,82)	143
SXT	1 (0,68)	0	2 (1,36)	-	144 (97,96)	147

mE, minor error; ME, major error; VME, very major error.

AMP, Ampicilina; AMC, Amoxicilina-ácido clavulânico; NOR, Nofloxacino; CIP, Ciprofloxacino SXT, Sulfametoxazol-trimetoprima.

DISCUSSÃO

Este trabalho fez uma comparação de leitura de halos e de interpretação de categorias visando avaliar a liberação de antibiograma do trato urinário de forma mais rápida. A comparação entre a leitura rápida (6h) e padrão (18h) mostrou tendência a aumento de halo para a maioria dos antibióticos, mas não mais que dois milímetros de diferença (o que foi considerado erro inerente da técnica). Sulfametoxazol-trimetoprima foi o único antibiótico que apresentou, além da tendência do aumento de halo, um percentual importante de diminuição de halo para alguns isolados o que se configurou em nos dois únicos isolados com VME, o que pode estar relacionado ao crescimento reduzido dentro do halo de inibição, devido à presença de antagonistas no meio, e que deve ser ignorado no momento da leitura.¹³

Considerando que os valores aceitáveis de erro são de até 10% de *minor error*, 3% de *major error* e 1,5% de *very major error*,¹⁴ os resultados encontrados nesse estudo estão dentro das margens aceitáveis. No Grupo A, para o qual realizamos dois comparativos, pudemos perceber resultados semelhantes de concordância utilizando tanto os pontos de corte "RAST" (rAST-U) quanto os pontos de corte padrão para leitura em 6h (AST-P6h). Para ambas leituras rápidas (rAST-U e AST-6h) observou-se *minor errors* para amicacina (1,5% rAST-U e 0,5% AST-6h), além de isolados na zona de "AIT" para ciprofloxacino (2% rAST-U e 1% AST-6h), já para gentamicina e meropenem encontramos 100% de concordância.

Após verificar esta concordância para as leituras em ambos documentos, analisamos os discos utilizados para o trato urinário (Grupo B) e que não apresentam pontos de corte no documento RAST. Nesta análise realizamos apenas o comparativo com os pontos de corte padrão em dois momentos de leitura (6 e 18h). Para esse grupo também observamos um

bom percentual de concordância e, conseqüentemente, baixos índices de erro. Porém, entre os erros encontrados, além de *minor error* e do *major error*, SXT apresentou 1,4% de VME, ficando muito próximo ao limite de erro, isso pode estar relacionado ao fato supracitado, que talvez prejudique a leitura rápida e gere resultados mais variados entre a leitura rápida e a padrão. Será necessário testar mais amostras para melhor avaliação deste antimicrobiano. Neste segundo grupo, para o qual também testamos ciprofloxacino, encontramos um percentual de concordância muito semelhante ao anterior, com 3,5% de amostras na zona de AIT na leitura de 18 horas. Estes isolados não foram contabilizados como erro, já que, de acordo com o documento padrão, isolados encontrados nesta zona não são confiáveis e requerem melhor análise.

Tendo em vista os bons percentuais de concordância encontrados, cabe mencionar que os isolados utilizados constituíram-se de bactérias muito sensíveis. Talvez em uma população mais resistente, com zonas mais "intermediárias" possam se encontrar resultados diferentes.

Embora a concordância das leituras rápidas (rAST-U e AST-6h) com a leitura padrão (AST-18h) tenham sido muito boas e parecem oferecer resultados confiáveis, na população estudada, a leitura rápida usando os pontos de corte padrão (AST-6h) apresentaram uma performance um pouco melhor que a leitura com pontos de corte rAST-U. Concluímos que talvez seja melhor utilizar os pontos de corte padrão para a leitura rápida (AST-6h), visto que os novos pontos de corte padronizados pelo EUCAST (rAST-U) devem ter maior valor para leitura de hemocultura, como o próprio documento indica, e não para isolados de urocultura com antibiograma realizado através de escala de McFarland. Além disso, AST-6h seria mais indicado porque inclui mais opções de antibióticos para tratamento de infecção urinária. Cabe mencionar que a leitura em 4 horas, conforme padronizado no documento RAST, não

foi possível de ser feita por não haver crescimento suficiente. A leitura em 4 horas talvez seja possível se for adicionado algum suplemento ao meio que torne o crescimento bacteriano visível para a leitura neste tempo de incubação. Mais estudos são necessários para verificar a utilização de pontos de corte para leitura rápida em uroculturas.

REFERÊNCIAS:

1. Oskouie, AN, Hasani, A, Rezaee, MA, et al. A relationship between O-serotype, antibiotic susceptibility and biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli*. *Microb Drug Resist*. 2019. doi: 10.1089/mdr.2018.0330
2. Smelov, V, Naber, K, Johansen, TEB. Improved classification of urinary tract infection: future considerations. *Eur Urol Suppl* 2016;15:71-80. doi: 10.1016/j.eur-sup.2016.04.002
3. Sundqvist, M., Olafsson, J., Matuschek, E. EUCAST breakpoints can be used to interpret direct susceptibility testing of Enterobacteriaceae from urine samples. *APMIS* 2014;123:152-155. doi: 10.1111/apm.12331
4. Karam, AK., Habibi, M, Bouzari, S. Urinary tract infection: Pathogenicity, antibiotic resistance and development of effective vaccines against uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Immunol* 2019;108:56-67. doi: 10.1016/j.molimm.2019.02.007
5. Kerremans, JJ, Verboom, P, Stijnen, T, et al. Rapid identification and antimicrobial susceptibility testing reduce antibiotic use and accelerate pathogen-directed antibiotic use. *J. Antimicrob Chemother* 2008;61(2):428-35. doi: 10.1093/jac/dkm497
6. Périllaud-Dubois, C, Pilmis, B, Diep J, et al. Prospective evaluation of rapid antimicrobial susceptibility testing by disk diffusion on Mueller-Hinton rapid-SIR directly on blood cultures. *Diagn. Microbiol Infect Dis* 2018;93:14-21. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.07.016
7. Machowska, A, Lundborg, CS. Drives of irrational use of antibiotics in europeu. *Int. J. Environ. Res. Public. Health*. 2018;16(1):27. doi: 10.3390 / ijerph16010027
8. Hombach, M, Jetter, M, Blochliger, N, et al. Rapid disc diffusion antibiotic susceptibility testing for *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Enterococcus* spp. *J Antimicrob Chemother* 2018. DOI: 10.1093/jac/dkx404
9. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Zone diameter breakpoints for rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) directly from blood culture bottles. [Internet] 2019 [citado em 2019 mar 05]. Disponível em: http://www.eucast.org/rapid_ast_in_blood_cultures/
10. Weme E.T. Rapid antimicrobial susceptibility testing of positive blood cultures by direct inoculation and reading of disc diffusion tests after 3-4 hours. *APMIS* 2018;126(11):870-876. doi: 10.1111/apm.12897
11. Matuschek E, Brown D, Kahlmeter G. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing methodology and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect* 2014;20(4):O255-66. doi: 10.1111/1469-0691.12373
12. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method. [Internet] 2019 [citado em 2019 abr 17]. Disponível em: http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology/
13. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. [Internet] 2019 [citado em 2019 mar 05]. Disponível em: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
14. Perdião-Neto, LV, Oliveira, MS., Rizek, et al. Susceptibility of multiresistant Gram-negative bacteria to fosfomicin and performance of different susceptibility testing methods. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58(3):1763-1767. doi: 10.1128/AAC.02048-13