

ANTIBIOGRAMA

www.profbio.com.br

Profa Alessandra Barone

Prof. Archangelo Fernandes

Antibiograma

- Prova de sensibilidade aos antibióticos
- Utilizado para microrganismos cuja sensibilidade às drogas normalmente não seja previsível
- Realizado em um isolado bacteriano de cultura recente

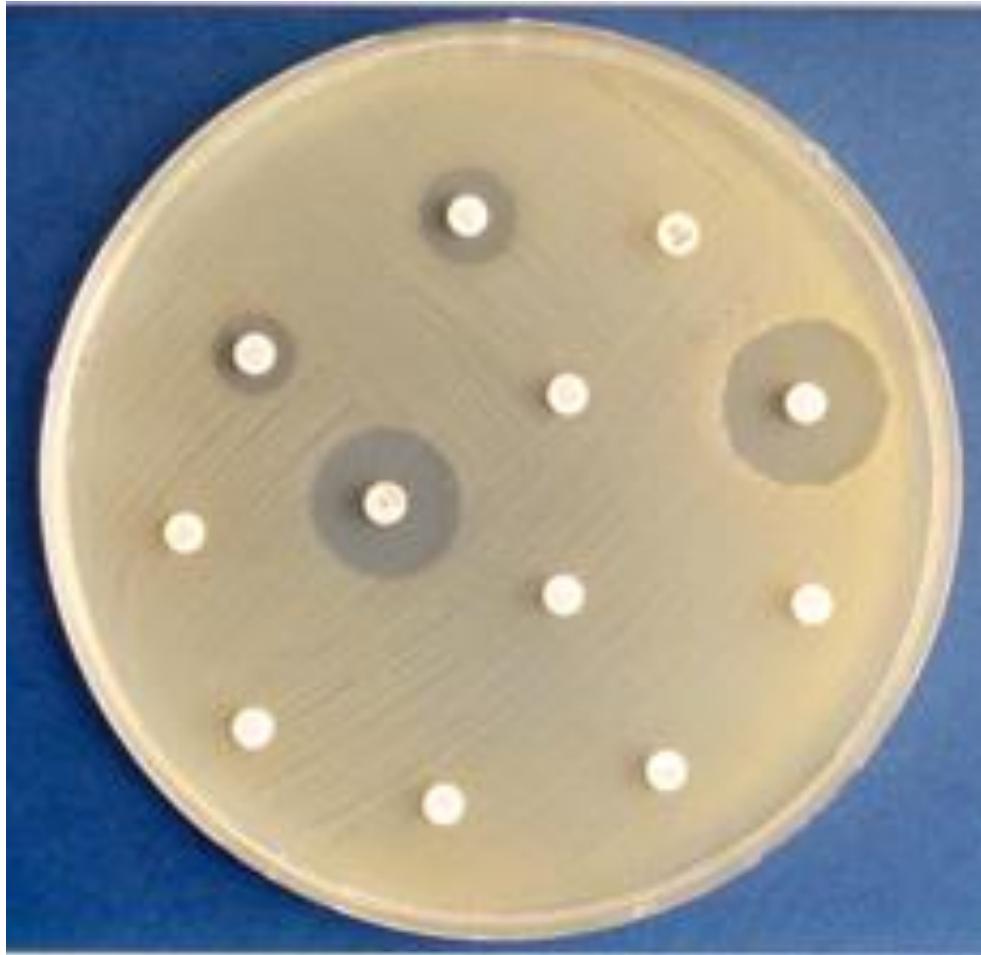
Teste de sensibilidade - Métodos

- Kirby-Bauer: Difusão com disco (disco-difusão)
- Diluição em caldo (macro ou micro)
- Etest®
- Automação

Métodos de sensibilidade: Difusão

- Utilização de discos de papel filtro impregnados com concentração padrão de antibiótico
- Os discos são colocados na superfície do ágar Mueller-Hinton semeado com uma suspensão padronizada da bactéria a ser testada.
- O método informa se a bactéria é resistente, sensível ou se possui sensibilidade intermediária à determinado antibiótico pela medição do halo de inibição

Métodos de sensibilidade: Difusão



Técnica

- Teste indireto: realizado com cultura pura de 24 horas de crescimento de bactérias devendo ser feito Gram antes do antibiograma.
- Teste direto: utilização do material pesquisado (urina, sangue, pus, etc). A desvantagem da utilização direta destes materiais dá-se pela dificuldade de controle da quantidade de inócuo e o isolamento da bactéria.

Técnica

- Com a alça de semeadura, transferir 3 a 4 colônias (teste indireto) com a mesma morfologia e inocular em 2,0 a 3,0 mL de solução fisiológica estéril, caldo MH ou caldo TSB.
- Esperar 15 minutos observando a turbidez da solução.
- Utilizar como referência de turbidez o tubo 0,5 da escala de McFarland

Escala de McFarland

- Padrão de turvação utilizado para determinar a intensidade de multiplicação bacteriana em meios de culturas líquidos
- O grau de turvação indica a [] das bactérias.
- O método consiste em uma escala de onze tubos 0,5 a 10 com diferentes quantidades de **cloreto de bário** e **ácido sulfúrico** para se obter diferentes concentrações de **sulfato de bário**.

	0,5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tubo	0,5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
n.Bact x 10 ⁸	1,5	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

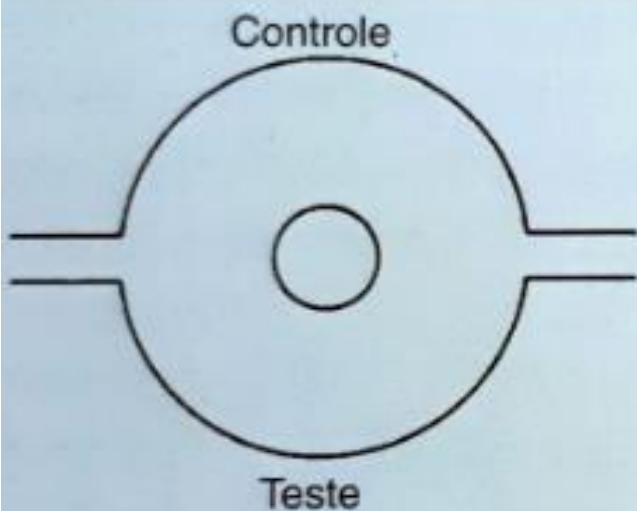


Técnica

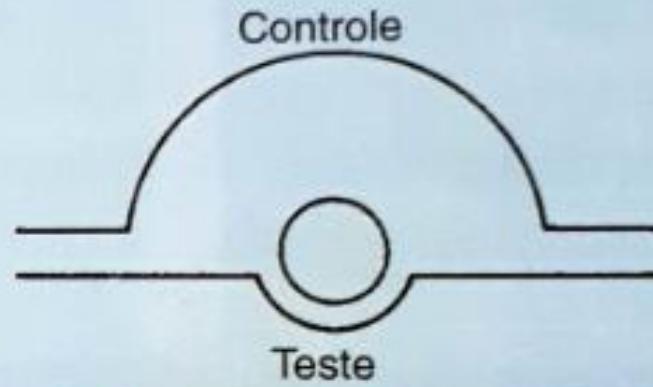
- Com um swab estéril, semear a solução no Agar Mueller-Hinton.
- Aguardar 5 minutos à temperatura ambiente para que o inócuo seja completamente absorvido pelo ágar.
- Colocar o disco com o auxílio de uma pinça previamente flambada.
 - Os discos devem ter uma distância de 2,5cm
 - Máximo de 12 discos em placas de 15 cm e 5 discos em placas de 9 cm

Técnica

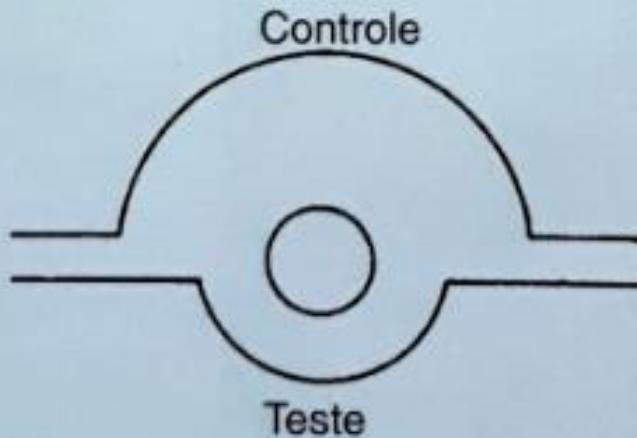
- Após 15 minutos da colocação dos discos, as placas são invertidas e incubadas
- Incubar de 18 a 24 horas à 35 +/- 1º C
- Medir o diâmetro dos halos.
- Classificá-los quanto a resistência, sensibilidade intermediária e sensibilidade.



A – Sensível: Quando o raio do halo de inibição da bactéria teste for igual ou maior que 3 mm do raio formado pela linhagem de controle.

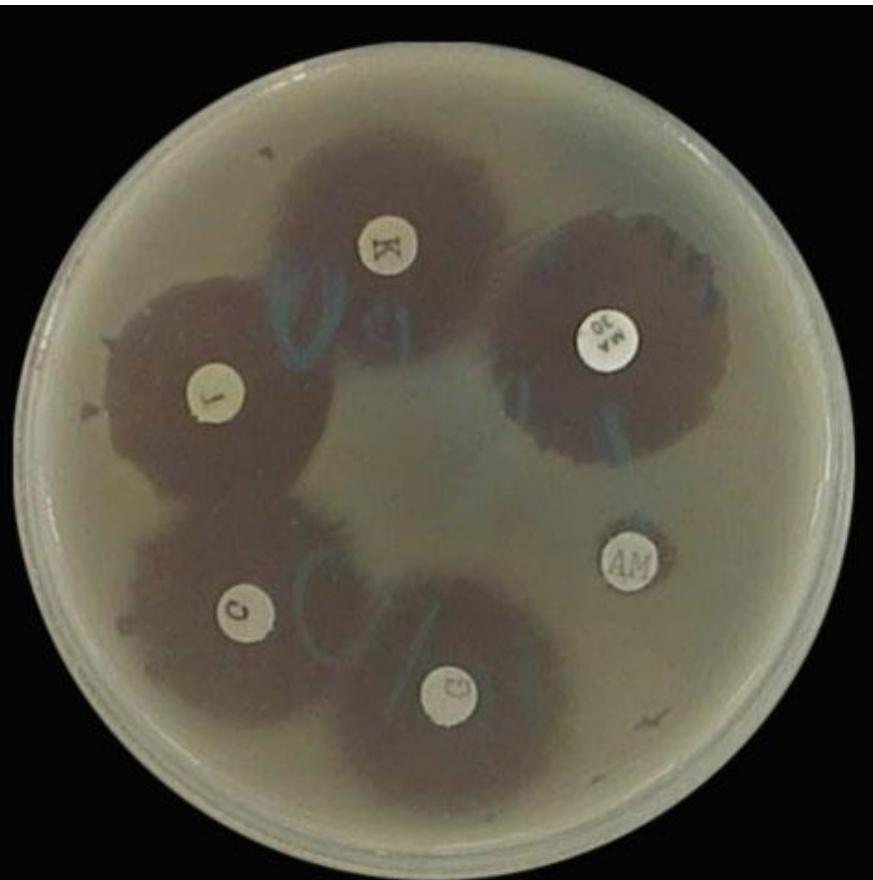


B – Resistente: Quando o raio formado pela bactéria teste for menor que 3 mm do raio com a linhagem de controle.

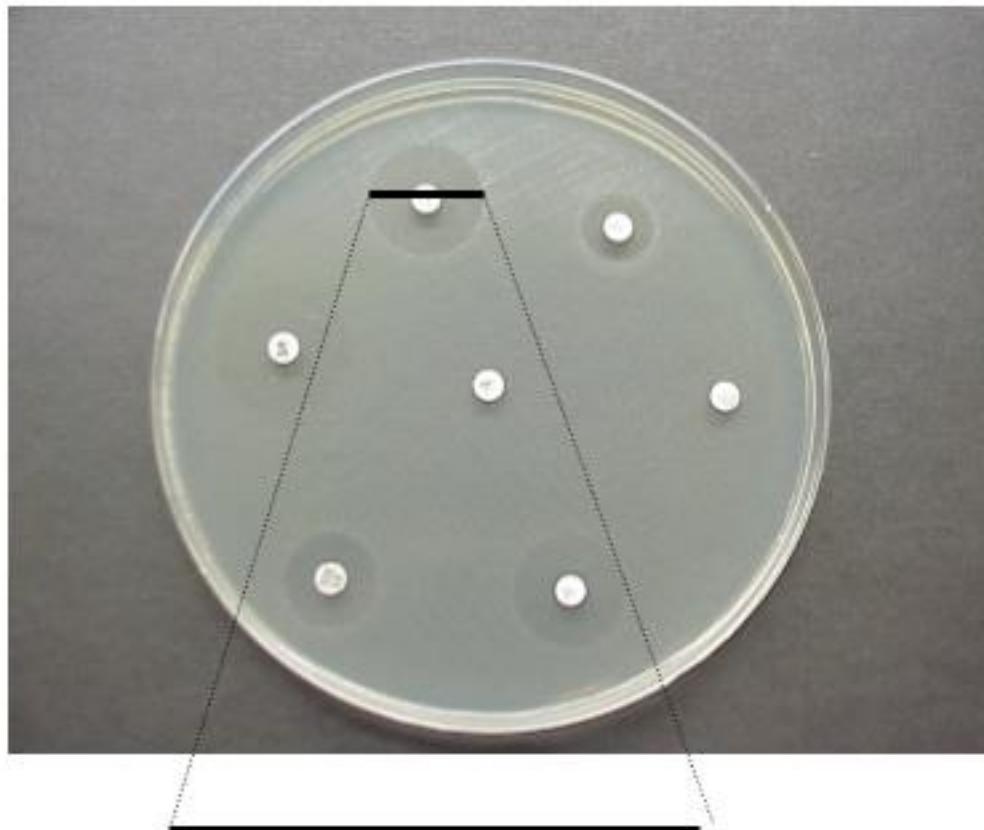


C – Sensibilidade moderada: Quando o raio do halo com a bactéria teste é maior que 3 mm, e ainda é 3 mm menor que o raio do halo da bactéria de controle.

Resultado



Leitura e interpretação



mm

Leitura realizada no fundo da placa com auxílio de uma régua

Fatores que influenciam o halo de inibição

- Composição do meio de cultura: algumas substâncias presentes no meio de cultura podem atuar na diminuição do halo de inibição.
 - Timidina ou purinas antagonizam alguns fármacos
- Por este motivo, utiliza-se a padronização do meio de cultura, utilizando-se para o antibiograma o meio **Mueller Hinton**.

Fatores que influenciam o halo de inibição

- Inócuo com mais de um microrganismo
- Alteração de pH
- Espessura do meio menos do que 4 mm
 - Ágar com menor profundidade aumenta a difusão e o diâmetro do halo
- Tempo e temperatura de incubação
- Armazenamento inadequado dos discos
- Discos não pressionados no ágar
- Erro na medição do halo

Fatores que influenciam o halo de inibição

- Densidade do inócuo: quanto maior o inócuo, menor a sensibilidade e por este motivo é necessária a utilização de uma padronização.

Fatores que influenciam o halo de inibição

- Difusibilidade do antibiótico: alguns antibióticos tais como **vancomicina** e **colistina** não se difundem rapidamente a partir do disco no ágar, por esta razão o diâmetro do halo é extremamente pequeno

Métodos de sensibilidade:

Diluição em caldo

- Verificação quantitativa da atividade do antibiótico para obtenção da concentração inibitória mínima capaz de inibir o crescimento bacteriano.
- Diluições do antibiótico são incorporadas ao meio de caldo ou ágar, o qual é inoculado com o organismo em teste.
- A menor concentração que inibe o crescimento na incubação de **12 horas** é conhecida como CMI (concentração inibitória mínima)

Métodos de sensibilidade:

Diluição em caldo

- Tubos de caldo ou placas de ágar são preparados com diluições sequenciais com valores expressos em $\mu\text{g}/\text{ml}$.
- Uma suspensão de bactérias padronizadas são inoculadas e incubadas
- A leitura é realizada pela turvação do meio que evidencia o crescimento bacteriano

Resultado

CIM - dose mínima de antibiótico que, adicionada ao meio de cultura (líquido ou sólido), é capaz de inibir totalmente o crescimento de um inócuo padrão.



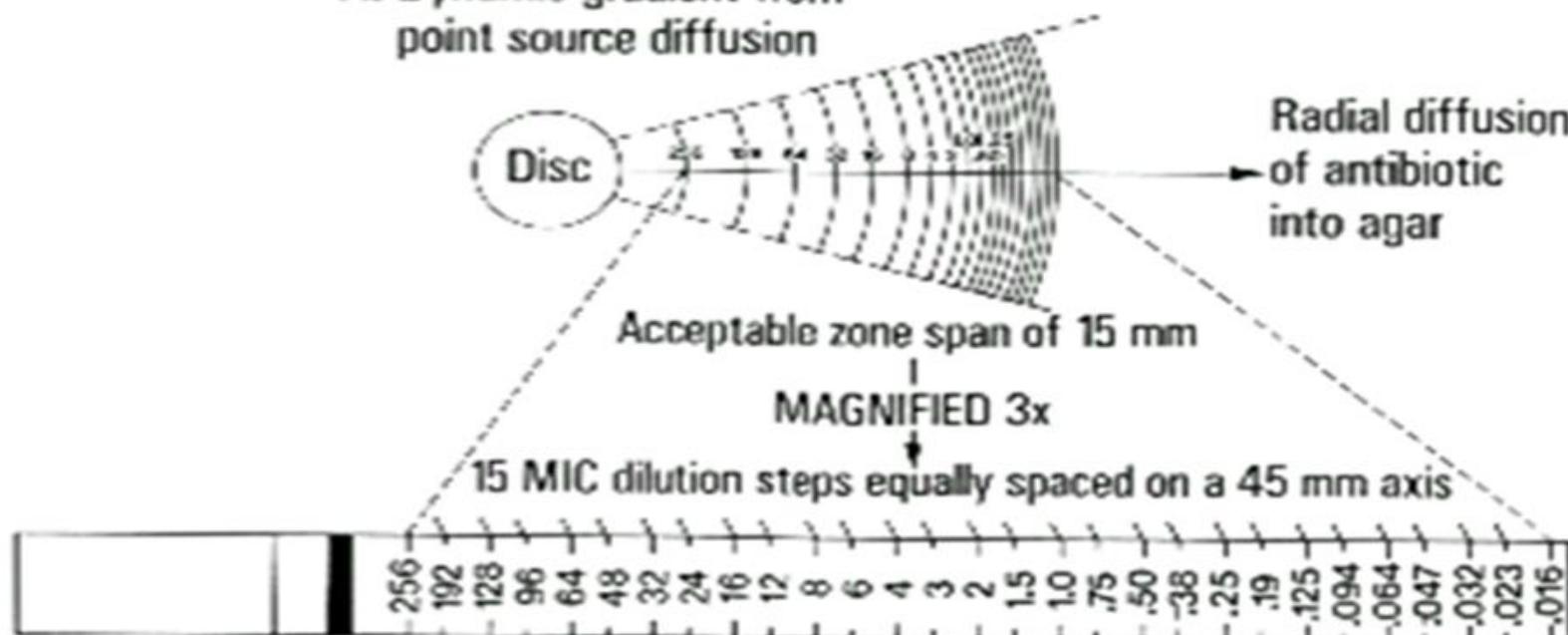
ETEST®

- Método de quantificação para obtenção da concentração inibitória mínima (CIM)
- Realizado através de utilização de uma fita (5 cm) que apresenta concentrações diferentes do antibiótico ao longo da fita.
- Método que combina os princípios de difusão e diluição

ETEST®

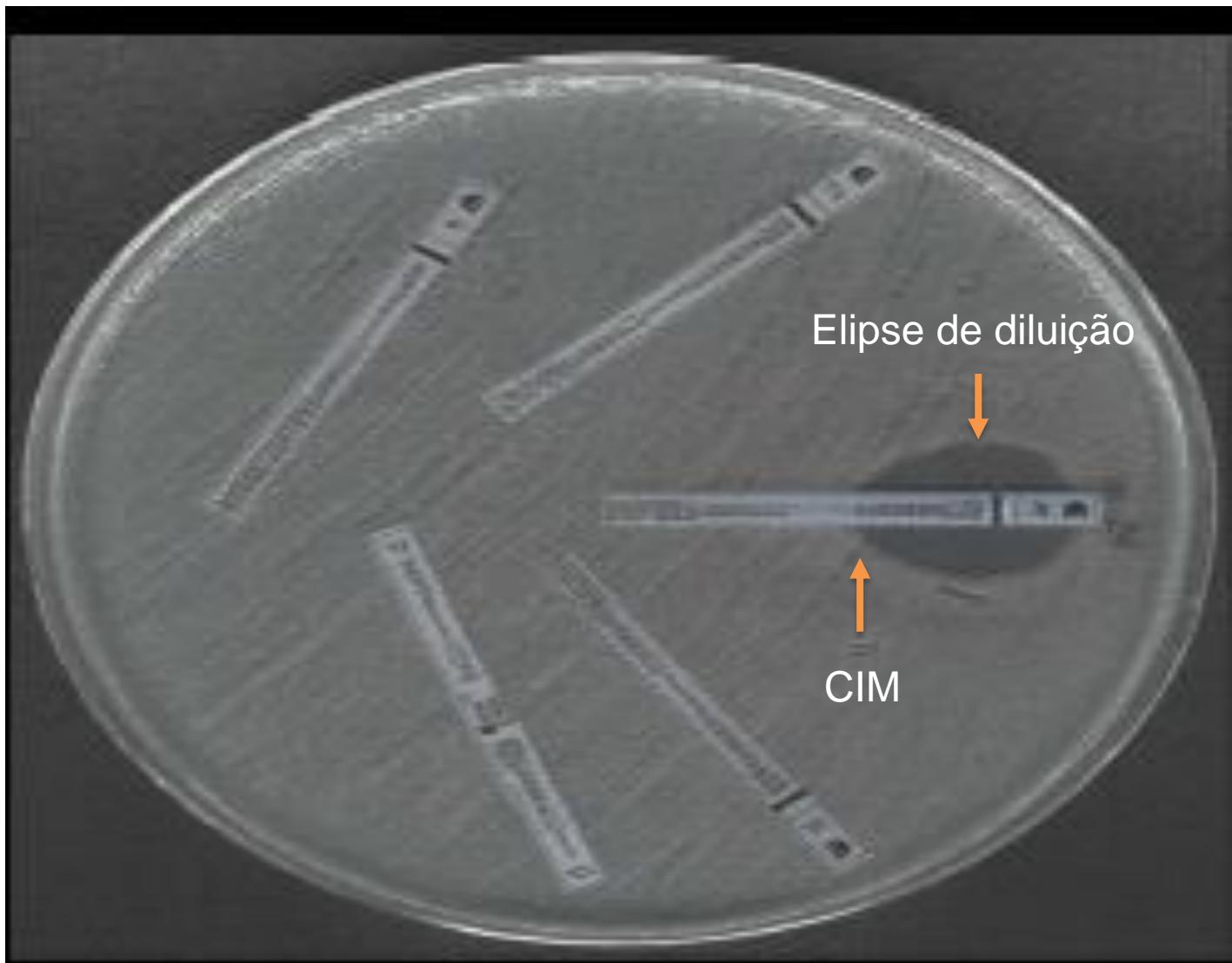
Schematic illustration of concentration gradients

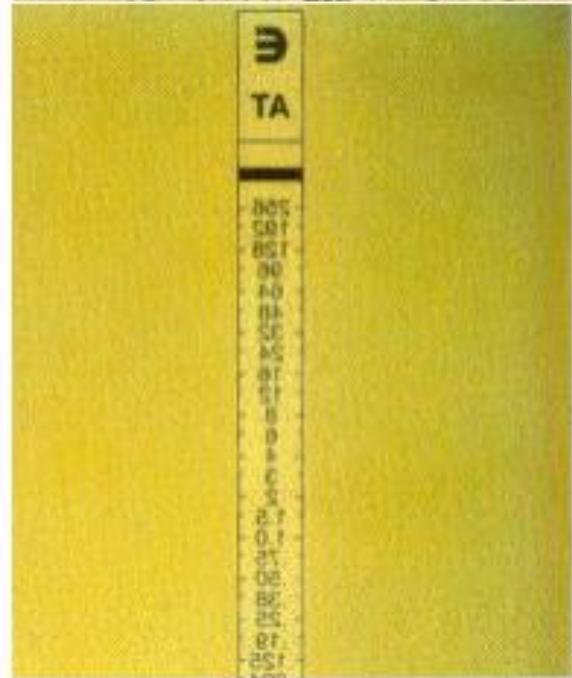
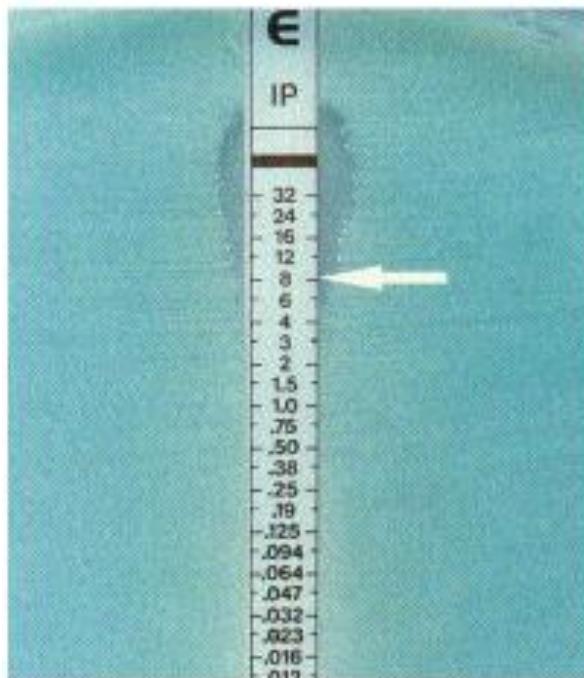
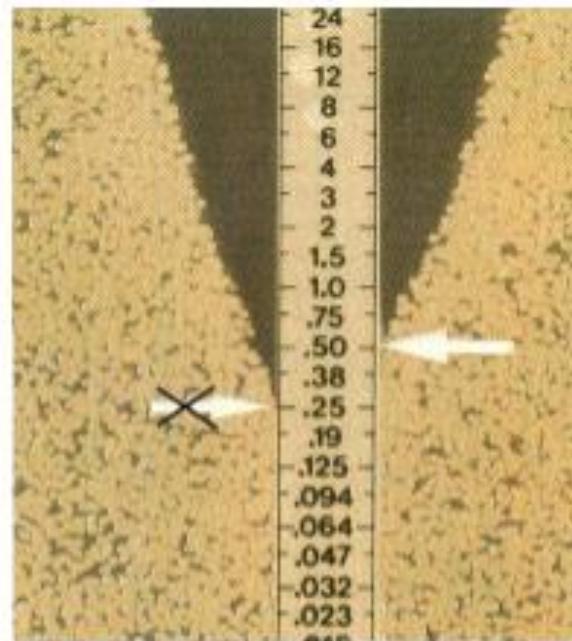
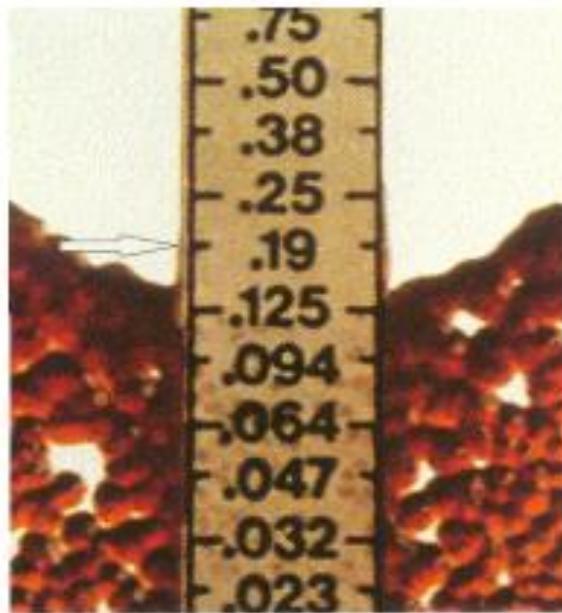
A. Dynamic gradient from point source diffusion



B. Stable, predefined gradient on a linear carrier

ETEST®







ETEST®

Evitar o uso de mais de 6 fitas em placas de 15 cm e mais de uma fita em placa de 9 cm.

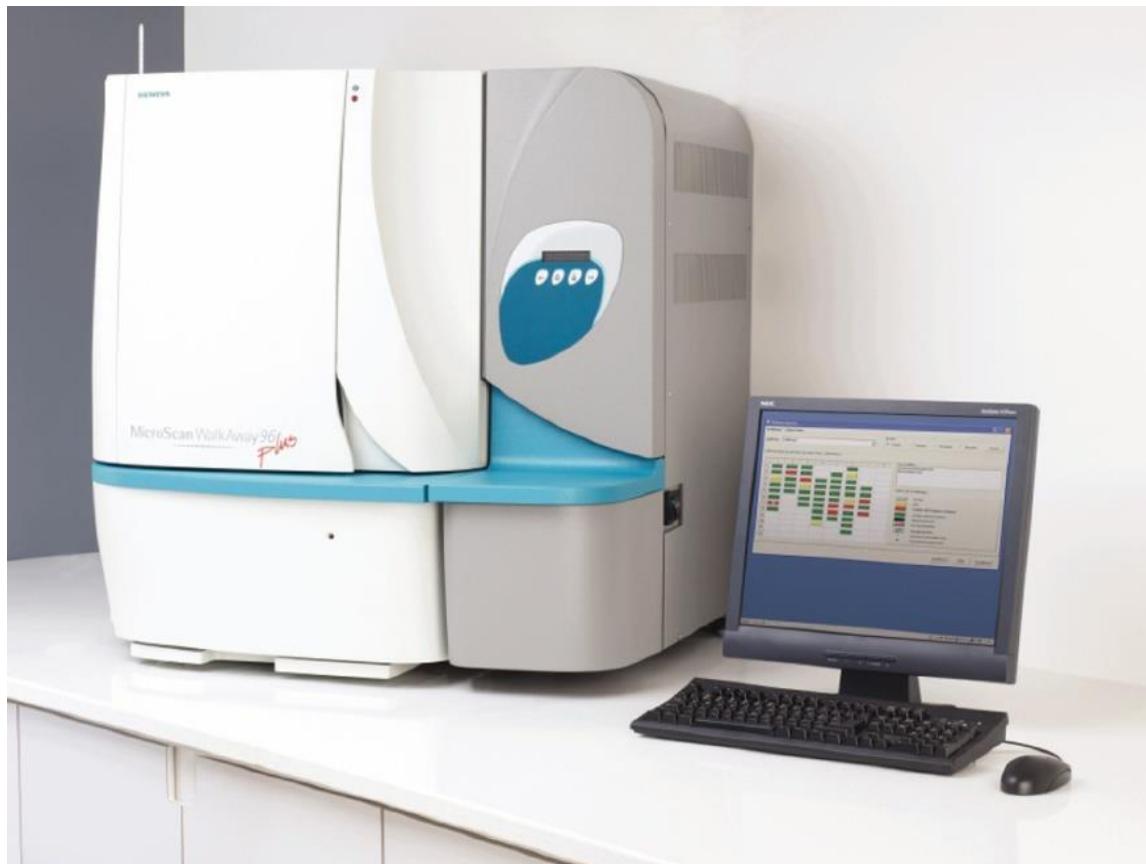


Automação Walk Away Plus 96

- Identifica bactérias Gram-Negativas fermentadoras e não-fermentadoras, Cocos Gram-Positivos e Listeria, Anaeróbicos, Leveduras e microrganismos fastidiosos como *Neisseria* e *Haemophilus*.
- Especifica a Concentração Inibitória Mínima com a utilização de uma ampla variedade de antibióticos

Automação

Walk Away Plus 96



Automação

Walk Away Plus 96

- Utiliza microplacas (painéis) de 96 poços, impregnados com a série bioquímica (cerca de 30 substratos) para a identificação bacteriana
- Agentes antimicrobianos com suas respectivas diluições para a susceptibilidade antimicrobiana com concentração inibitória mínima.
- Contém cerca de 20 ou mais antibióticos por painel, dependendo do tipo de painel.

Automação Walk Away Plus 96



Antibióticos

- Inibição da síntese de parede celular
- Inibição da síntese de proteínas
- Inibição da transcrição e replicação
- Lesão de membrana plasmática

Antibióticos

- **Inibição da síntese da parede celular:**

- Betalatânicos: Ligam-se a PLPs (proteínas de ligação da penicilina) e enzimas responsáveis pela síntese de peptideoglicano
 - Penicilina: oxacilina, amoxicilina, meticilina, etc
 - Cabapenens: imiprenem, meropenem, etc
 - Cefalosporina
- Antibiótico polipeptídico
 - Bacitracina
- Antibióticos glicopeptídicos
 - Vancomicina

Antibióticos

- **Inibição da síntese protéica:**
 - **Tetraciclina** : Impede o alongamento do polipeptídeo no ribossoma 30S
 - **Macrolídeo**: Impede o alongamento do polipeptídeo no ribossoma 50S
 - Eritromicina, azitromicina, claritromicina, etc.
 - **Aminoglicosídeo**: Liga-se a proteínas ribosomais
 - Estreptomicina

Antibióticos

- **Inibição da síntese de ácidos nucléicos :**
 - Quinolona: Liga-se a subunidade alfa da DNA-dependente
 - Rifampina : Impede a transcrição da RNA-polimerase DNA dependente
 - Metronidazol: Impede a transcrição da RNA-polimerase DNA dependente

Resistências bacterianas de importância clínica

- *Klebsiella pneumoniae* resistentes à cefoxitina e ceftazidima (cefalosporinas)
- *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina;
- *Staphylococcus* – resistente a β - lactâmicos e vancomicina;
- *Streptococcus β-hemolíticos* – resistente à penicilina;
- *Streptococcus viridans* - vancomicina;
- *Neisseria gonorrhoeae* - resistente à ceftriaxona;
- *Neisseria meningitidis* - resistente à penicilina;
- *Enterobactérias* - resistentes ao imipenem.

Década de 60 – resistência à penicilina – produção de beta-lactamases

Década de 70 – surgiram cepas resistente à meticilina (MRSA) ou à oxacilina (ORSA)

S. aureus resistente à todos os beta-lactâmicos;



Ocorre uma alteração do sítio de ação dos beta-lactâmicos



Alteração das proteínas ligadoras de penicilinas denominadas PBPs-
(importantes na síntese da parede bacteriana)

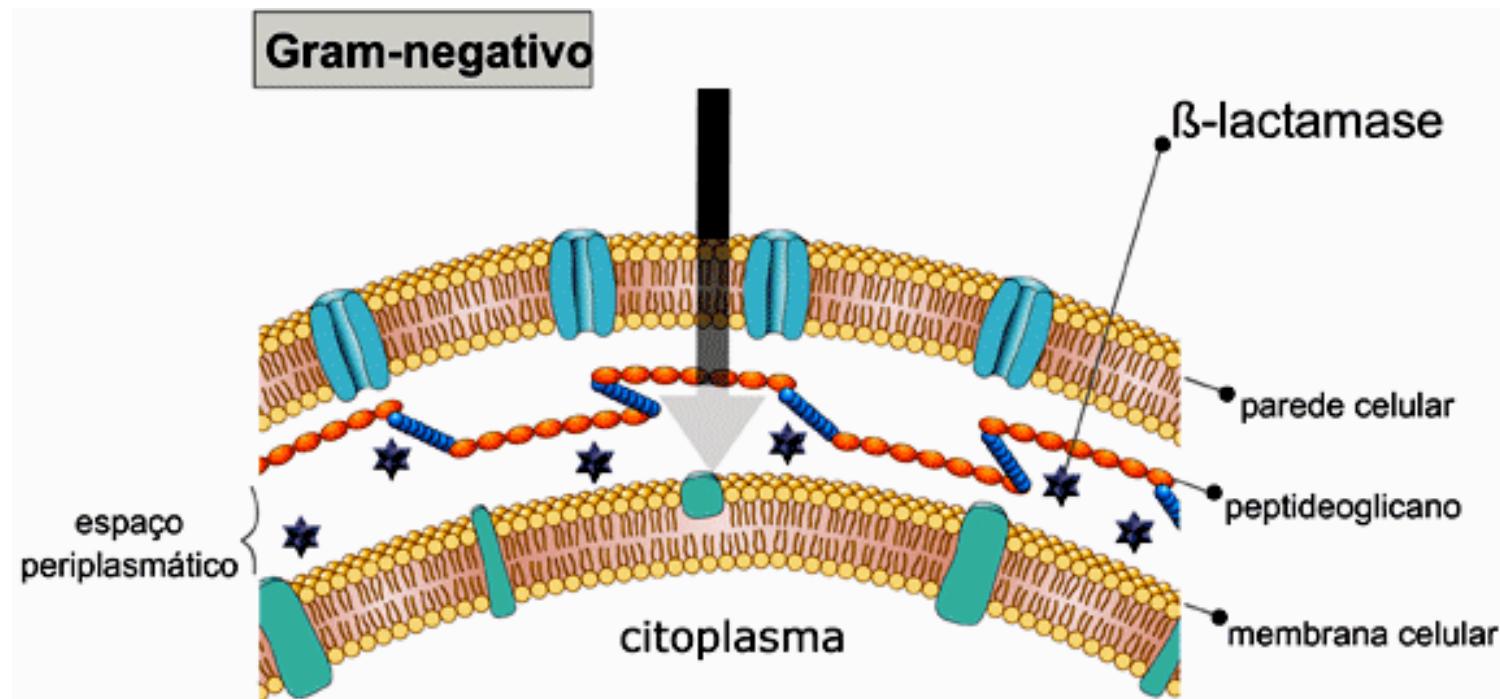


A presença de enzima alterada, denominada **PBP2a ou PBP2'**, leva a baixa afinidade da oxacilina pelo local de ligação na parede celular da bactéria com consequente inatividade.



Gene *mecA*

Detecção de beta-lactamase (ESBL)



Detecção de ESBL

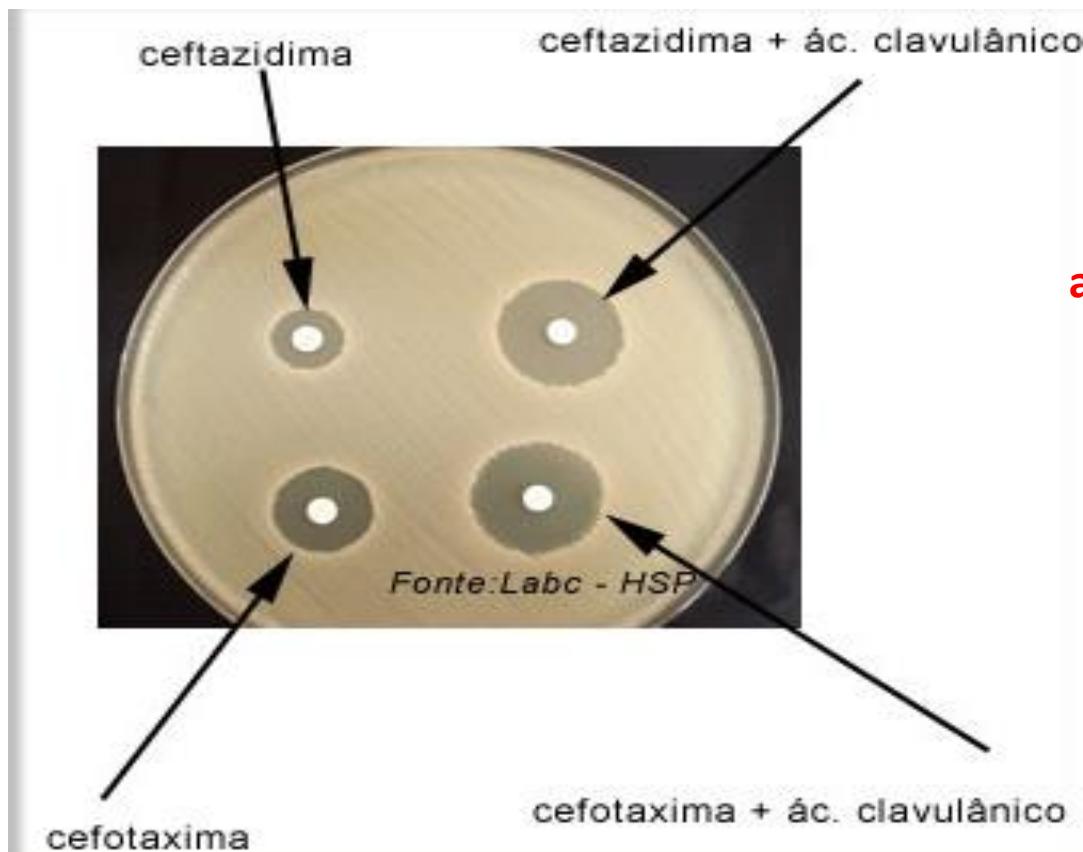
- **ESBL: betalactamases de espectro ampliado**
 - Podem ser produzidas durante a terapêutica antimicrobiana
 - hidrolisam todos os β -lactâmicos, à exceção dos carbapenems e cefamicina
 - Triagem para *E.coli*, *K. pneumoniae*, *K.oxytoca* e *P.mirabilis*
 - Os inóculos devem ser padronizados para escala 0,5 de McFarland
 - Discos utilizados: cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, etc.

Detecção de ESBL

- Na rotina diária, faz-se necessária a realização das duas etapas:
 - Teste de triagem por disco-difusão, cujo resultado é alcançado através da leitura do diâmetro dos halos de inibição
 - Teste confirmatório baseia-se na inibição da atividade da enzima na presença do ácido clavulânico.
 - Realização de comparação do halo de inibição do β -lactâmico àquele do mesmo antimicrobiano associado ao ácido clavulânico.

Detecção de beta-lactamase (ESBL)

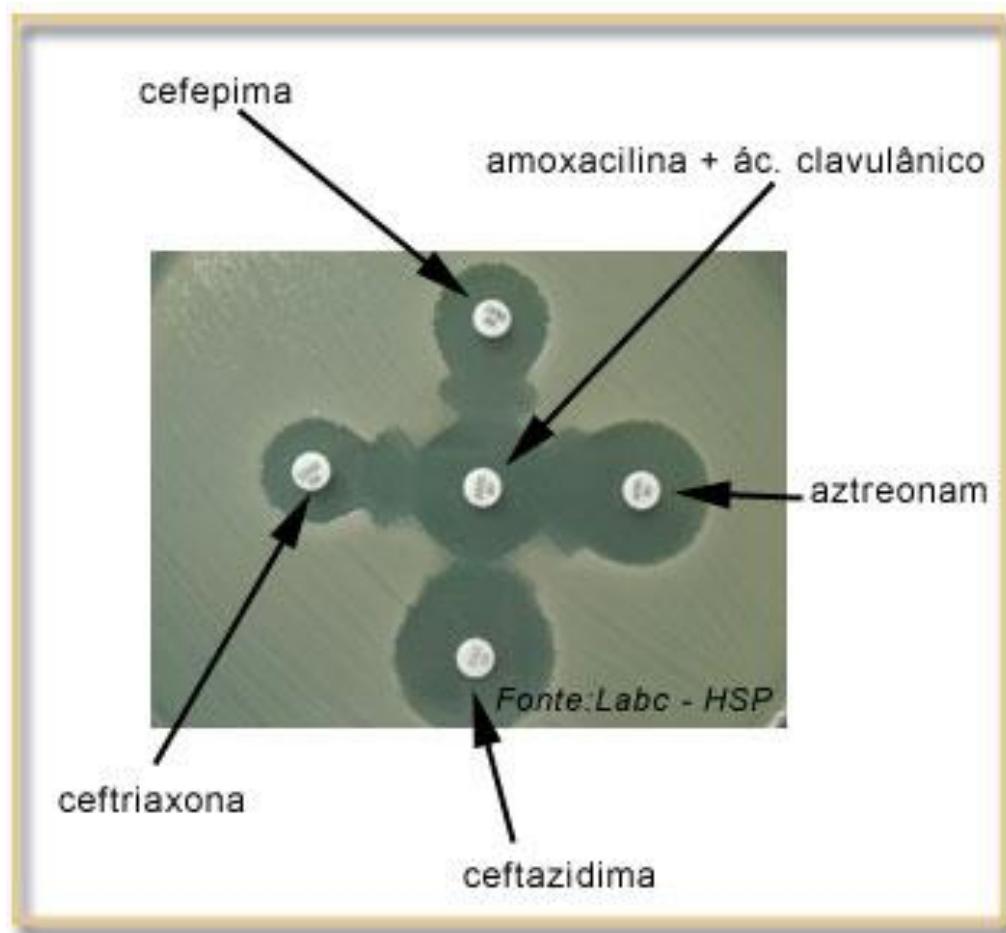
Detecção fenotípica de uma amostra de
K. pneumoniae produtora de ESBL

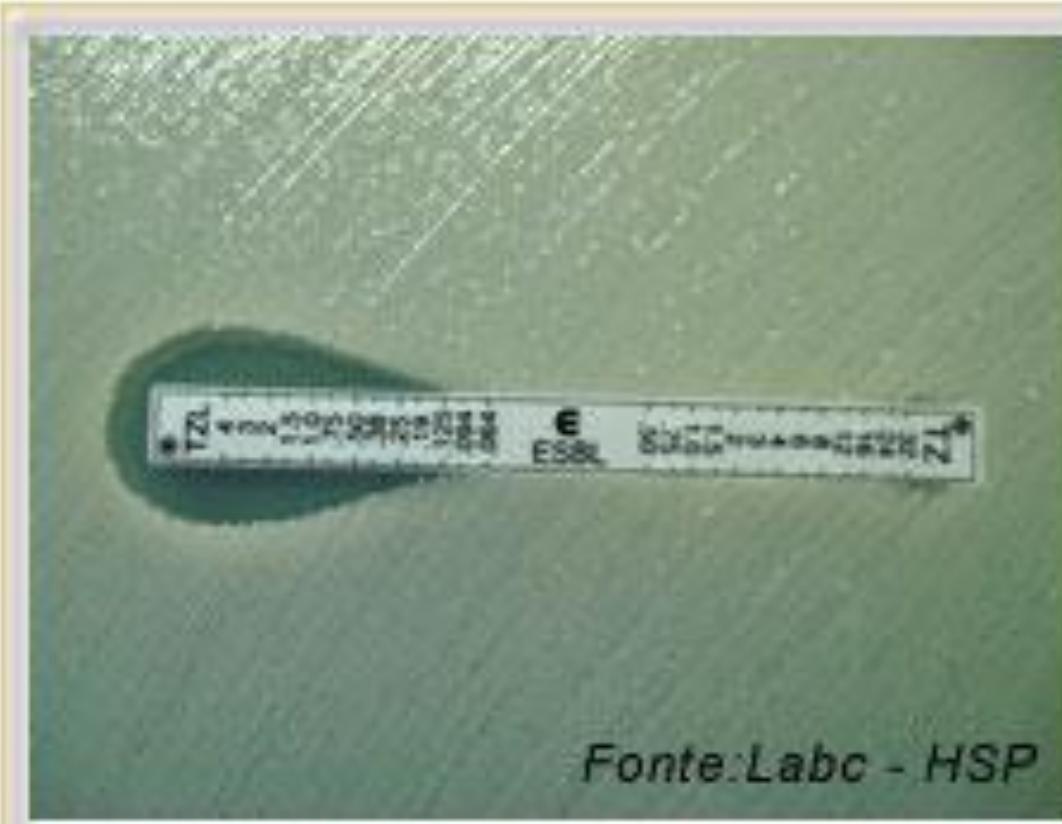


O resultado positivo com
aumento do halo de inibição
 ≥ 5 mm em comparação
àquele do β -lactâmico
sozinho

Detecção de beta-lactamase (ESBL)

Teste de aproximação dos discos:



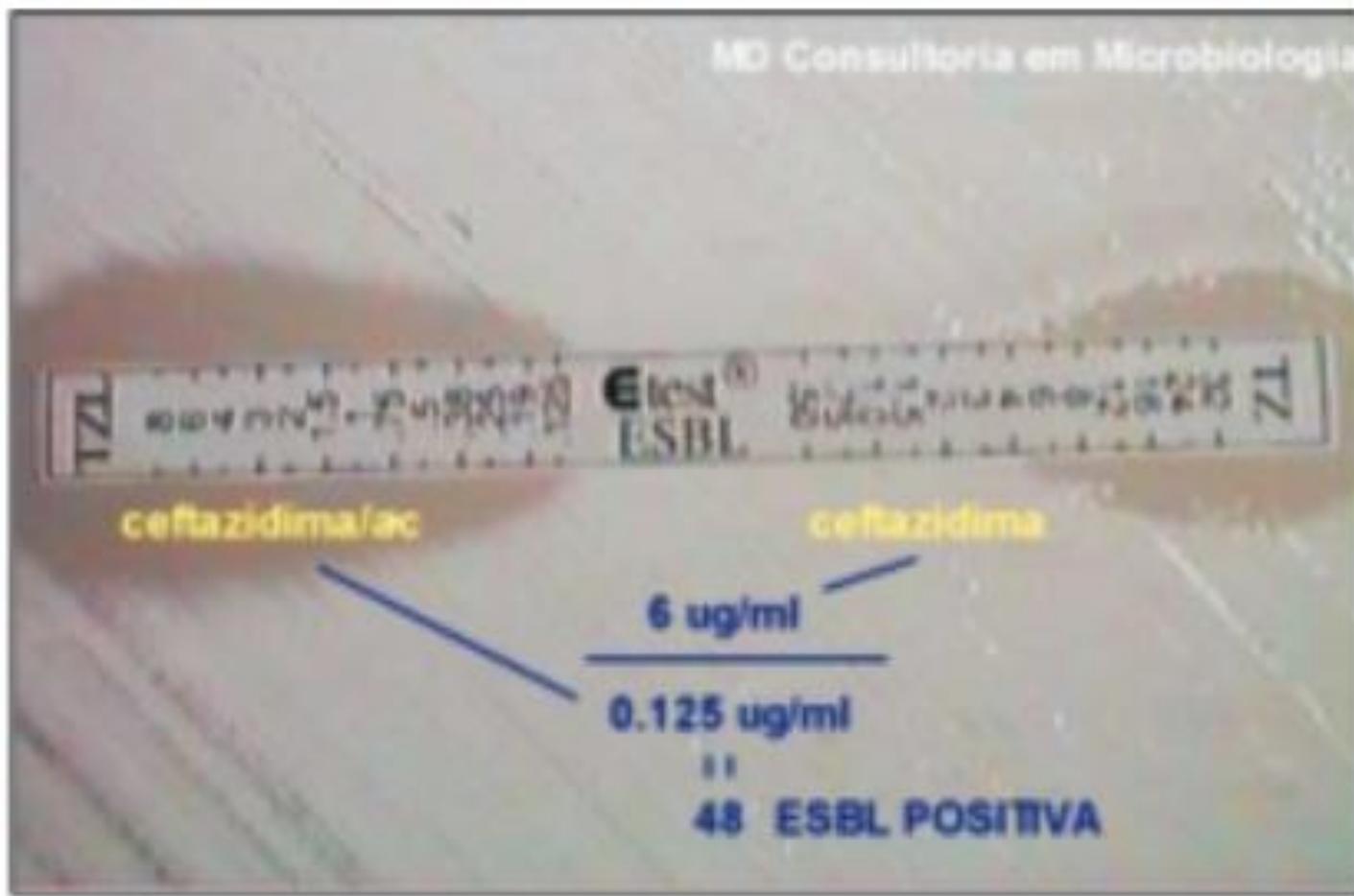


Fonte: Labc - HSP

ceftazidima, cefotaxima ou
cefepima associado ao ácido
clavulânico

ceftazidima, cefotaxima e cefepima

Observar que houve uma redução da CIM > 3
diluições para associação de ceftazidima/ácido
clavulânico, CIM 0,125 µg/mL.



Detecção de Resistência

- Resistência de *S.aureus* a oxacilina/meticilina - MRSA
- Amostras de *Staphylococcus* spp. resistentes à oxacilina, são resistentes a todos os β-lactâmicos
- Realizada com disco de **cefoxitina** 30µg
- Amostras de *S. aureus* e *S. lugdunensis* com halo de inibição ≤ 21 mm para cefoxitina devem ser reportadas como resistentes à oxacilina

Resistência de *S.aureus* a oxacilina/meticilina



Sensibilidade a cefoxitina : ≥ 22 mm



Resistência a cefoxitina: ≤ 21 mm



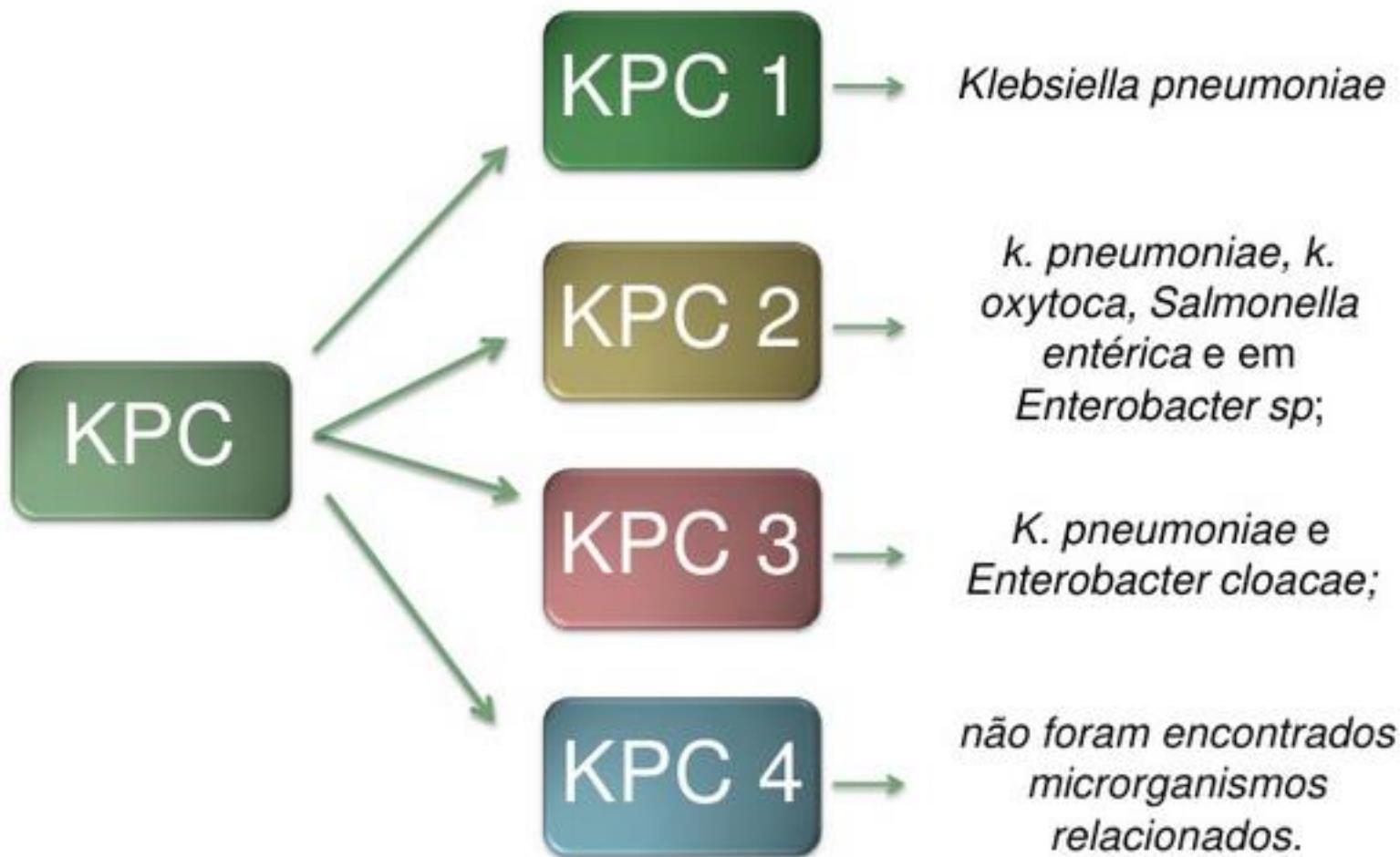
Meio cromogênico
destinado ao isolamento e
diferenciação de
Staphylococcus aureus
resistente à meticilina
(MRSA).

KPC (*Klebsiella pneumoniae* *carbapenemase*)

- As enzimas **KPC** são inibidas por ácido clavulânico e tazobactam e, possuem a habilidade de hidrolisar uma grande variedade de β -lactâmicos como cefalosporinas, penicilinas, aztreonam e inclusive, os **carbapenêmicos**.

KPC (*Klebsiella pneumoniae* *carbapenemase*)

- Encontrada pela primeira vez em *K. pneumoniae*
- Atualmente já foram descritos casos de resistência pela presença de KPC em *Salmonella enterica*, *K. oxytoca* e *Enterobacter spp*, entre outros.
- Apresenta alto potencial de disseminação devido à sua localização em **plasmídio**



Teste de sensibilidade a carbapenêmicos em *Enterobacteriaceae*

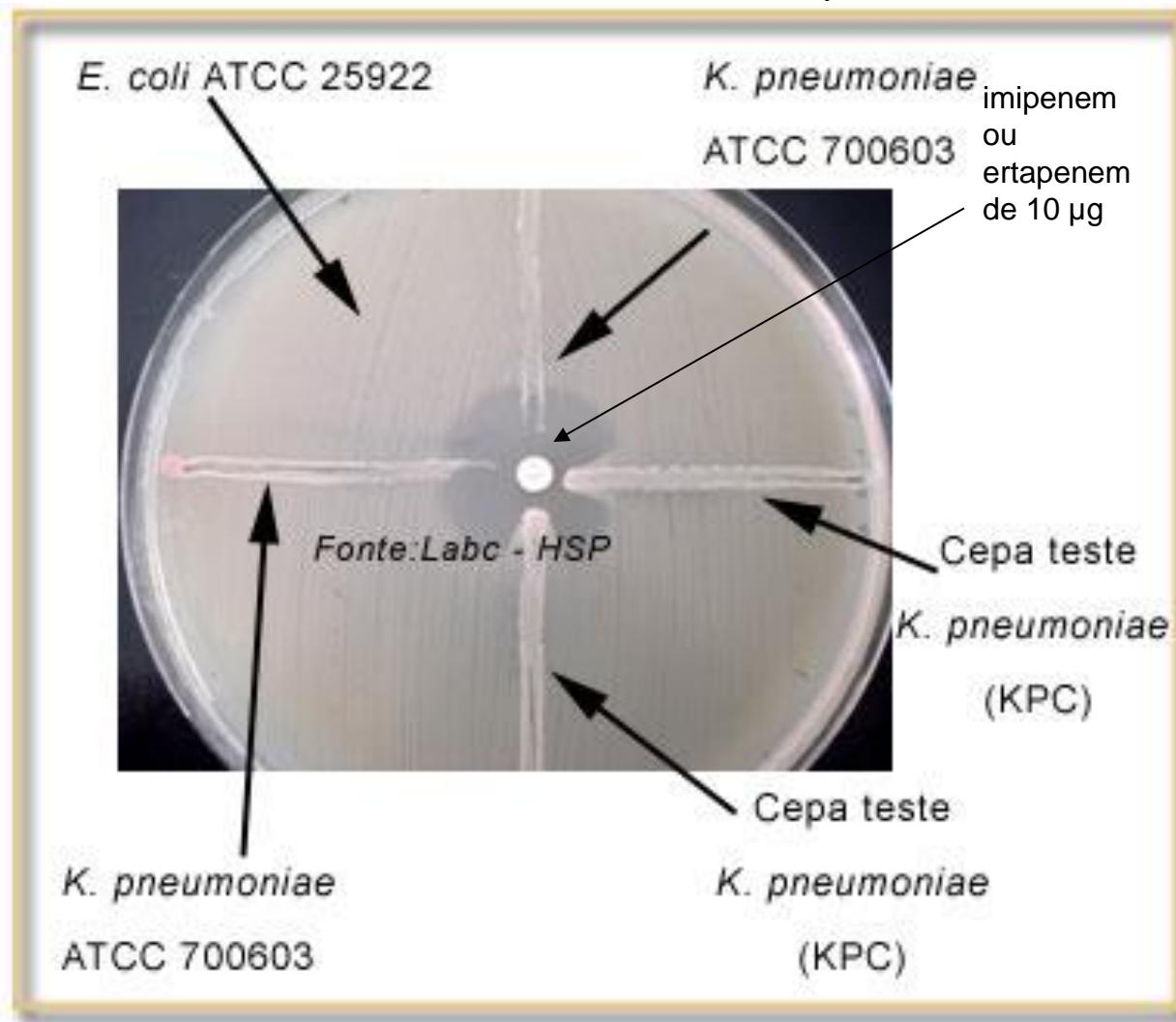
	Disco Difusão (mm)		
	Sensível	Intermediário	Resistente
Imipenem	≥ 23	20-22	≤19
Meropenem	≥ 23	20-22	≤19
Ertapenem	≥ 23	20-22	≤19
Doripenem	≥ 23	20-22	≤19

Fonte: CLSI (Suplemento M100-S20-U) Junho, 2010.

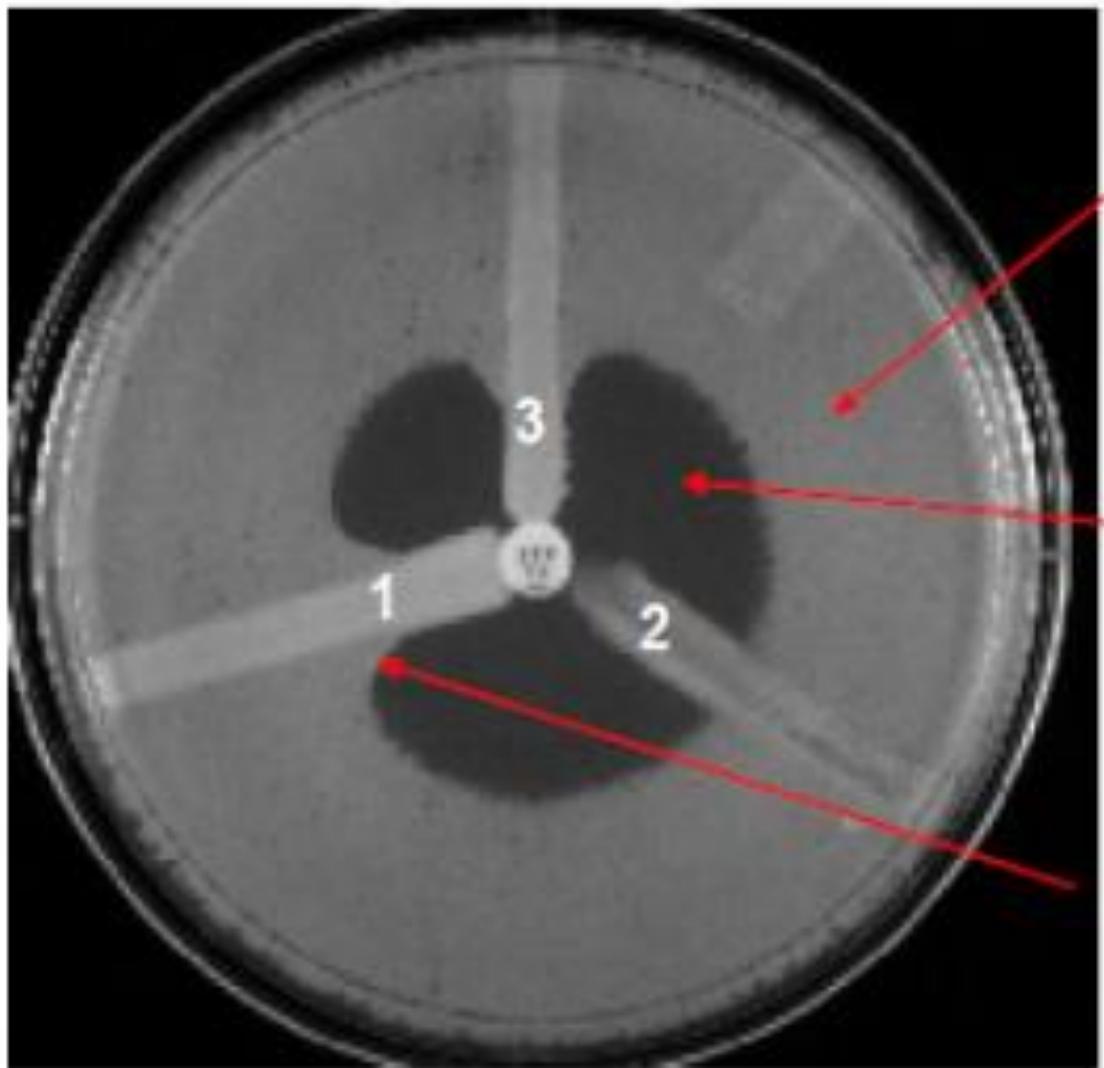
Teste de sensibilidade a carbapenêmicos em *Enterobacteriaceae*

	CIM ($\mu\text{g/mL}$)		
	Sensível	Intermediário	Resistente
Imipenem	≤ 1	2	≥ 4
Meropenem	$\leq 0,25$	0,5	≥ 1
Ertapenem	≤ 1	2	≥ 4
Doripenem	≤ 1	2	≥ 4

Para as amostras nas quais o teste de triagem for positivo para produção de KPC, pode ser realizado o Teste de Hodge. Modificado como teste confirmatório fenotípico



Presença de distorção do halo de inibição, indicativa da produção de carbapenemase pela amostra de *K. pneumoniae* testada, pelo método de disco-difusão.



E. coli ATCC® 25922

Halo de inibição de
E.coli

Alteração do halo de
inibição por *K.*
Pneumoniae

FIM