

ANTIBIOGRAMA

A principal função dos antibiogramas é identificar, em amostras microbiológicas provenientes de coletas laboratoriais e hospitalares, a sensibilidade ou resistência do microrganismo responsável pela infecção, permitindo escolher o antibiótico mais adequado ao tratamento, bem como sua quantidade. Esses testes frequentemente são indicados quando da possibilidade de o agente infeccioso pertencer a uma espécie com capacidade de resistência aos antibióticos comumente utilizados na terapêutica. Além disso, os testes de sensibilidade são importantes em estudos epidemiológicos de resistência e na avaliação de novos antibióticos.

Alguns antibióticos são bactericidas (eliminando completamente os microrganismos, por impedirem a formação da membrana citoplasmática ou da parede celular), enquanto outros são bacteriostáticos (apenas impedindo que os microrganismos se multipliquem durante o período de utilização do medicamento, pela modulação negativa da síntese de DNA ou de proteínas, restando a célula em uma fase do ciclo celular e a impedindo de prosseguir com a divisão). Além disso, apresentam padrões diferentes de distribuição no organismo, devido às diferenças de solubilidade, tornando-os eficazes contra uma bactéria, mas ineficazes para tratamento, por não atingirem a concentração adequada nos tecidos. De maneira geral, os antibióticos de espectro restrito são mais bactericidas e os de amplo espectro, mais bacteriostáticos.

O uso indiscriminado de antibióticos favorece o desenvolvimento de cepas resistentes e colabora para a seleção destas, eliminando a maioria das populações de bactérias que se apresentam sensíveis. Dentre os ambientes mais propícios ao surgimento de cepas resistentes, encontram-se os hospitais, onde as infecções comumente são provocadas por cepas multirresistentes. A origem da resistência pode

ser não genética (microrganismos que desenvolvem resistência enquanto estão metabolicamente inativos, ou seja, não estão em fase de multiplicação) ou genética (processos de seleção natural consecutivos ou alterações genéticas, sendo estas cromossômicas ou extracromossômicas). Ainda, algumas bactérias são intrinsecamente resistentes a certas classes de antibióticos, como o *Staphylococcus saprophyticus* à novobiocina e o *Proteus* sp. às polimixinas, constituindo um dado muito útil para a identificação microbiana.

Basicamente, são utilizados dois métodos para análise da suscetibilidade aos antimicrobianos: diluição em tubo e difusão em disco (Kirby-Bauer). Ainda, é possível avaliar a atividade microbiana de um antibiótico por meio da determinação da concentração inibitória mínima (MIC, do inglês *minimum inhibitory concentration*). Essa análise mostra a menor quantidade necessária do antibiótico para impedir o crescimento do microrganismo em questão e a determinação da concentração bactericida mínima (MBC, do inglês *minimum bactericidal concentration*), ou seja, a concentração mínima de antibiótico capaz de matar todos os microrganismos.

No método da diluição em tubo, são utilizadas diversas diluições do antibiótico, permitindo a determinação da MIC ou da MBC. No primeiro caso, uma suspensão de bactérias com quantidade padronizada (5×10^5 UFC/mL) é inoculada em tubos contendo diferentes diluições do antibiótico, geralmente sequências múltiplas de 2, expressas em $\mu\text{g/mL}$, para se verificar qual é a diluição mais alta (concentração mais baixa de antibiótico) capaz de impedir o crescimento microbiano. A turbidez dos tubos serve como parâmetro para a avaliação do crescimento, demonstrando o índice de crescimento em cada tubo.

No segundo caso, o procedimento é semelhante: preparam-se placas com meio de cultura contendo diferentes diluições do antibiótico e inocula-se a suspensão bacteriana padronizada. A diluição do antibiótico capaz de eliminar totalmente os microrganismos e impedir seu crescimento em meio de cultura sem o antibiótico é definida como a concentração bactericida mínima. A figura a seguir mostra os dois tipos de determinação da concentração (inibitória mínima e bactericida mínima):

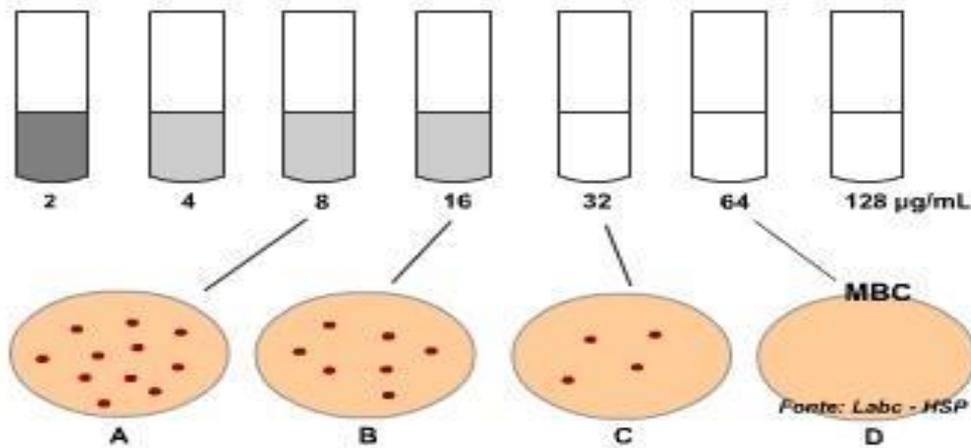


Figura 1 – MIC e MBC. Fonte: ANVISA (2008).

Na parte superior da figura, pode-se perceber que não houve crescimento bacteriano na concentração de 32µg/mL; portanto, esta é a MIC. Na segunda etapa, as diluições de 8, 16, 32 e 64µg/mL foram transferidas para as placas contendo meio de cultura sem o antibiótico. A diluição que impediu o crescimento bacteriano (placa D) determinou a MBC: 64µg/mL.

O método de difusão em disco, descrito por Kirby & Bauer em 1966, é um método qualitativo, considerado como “padrão ouro” para testes de sensibilidade a antimicrobianos. Nele, diversos antibióticos impregnados em pequenos discos de papel são fixados em ágar Mueller-Hinton contendo a bactéria-teste inoculada de maneira homogênea, formando um “tapete” em cima do ágar. Após incubação de 18 a 24 horas em temperatura adequada para a bactéria em questão, analisa-se sua sensibilidade ou resistência frente aos antibióticos testados.

A inoculação microbiana é realizada em meio de cultura líquido, diluído até que sua turbidez esteja próxima de 0,5 de densidade óptica. Essa turbidez é alcançada comparando a diluição à escala-padrão McFarland e corresponde a uma concentração de cerca de 15×10^8 células/mL. O espalhamento na placa de Petri contendo o ágar é realizado com um *swab* de algodão estéril, por toda a superfície, de maneira que nenhum espaço fique sem preenchimento, para que o crescimento microbiano ocorra por todo o meio de cultura.

A escolha de quais antibióticos serão testados depende de cada laboratório, juntamente com especialistas em doenças infecciosas e farmacêuticos, além de comitês de farmácia, terapêutica e controle de infecção hospitalar. Na seleção de antibióticos para grupos específicos de testes/classes de antibióticos, devem ser considerados: eficácia clínica; prevalência de resistência; minimização do surgimento de resistência; custos; indicações da Food and Drug Administration (FDA) ou do Ministério da Saúde; e as atuais recomendações consensuais para fármacos de primeira escolha e alternativos.

Caso o microrganismo seja sensível a um antibiótico, uma zona clara (halo de inibição) se forma em torno do disco, significando que, nessa região, o antibiótico impediu seu crescimento (Figura 2). Não são aceitáveis testes de disco-difusão baseados somente na presença ou ausência do halo de inibição, sem considerar seu diâmetro. O diâmetro do halo de inibição depende da sensibilidade microbiana ao antibiótico e da habilidade deste de se difundir através do ágar.

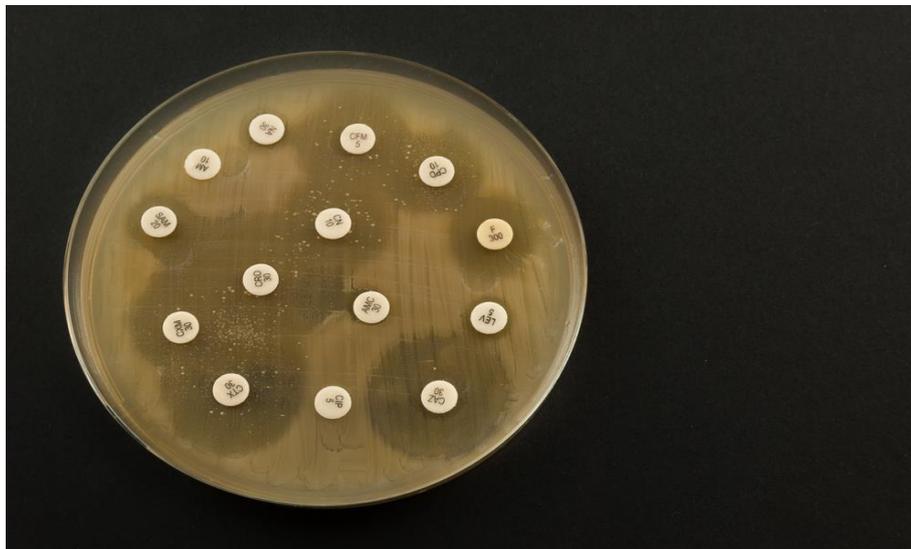


Figura 2 – Antibiograma por disco-difusão. Fonte: SHUTTERSTOCK.

Os diâmetros são comparados aos critérios estabelecidos pelo Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI), pelo European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) ou pelo Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST), para classificação do microrganismo em sensível,

intermediário ou resistente (Figura 3). Só é possível obter resultados confiáveis com testes que utilizam as medidas dos diâmetros correlacionados às MICs com cepas reconhecidamente sensíveis e resistentes a diversos agentes antimicrobianos. Devem ser levados em consideração vários fatores que podem afetar o tamanho da zona de inibição, como: meio de cultura utilizado e sua espessura na placa; inóculo fora do padrão ou contendo mais de um microrganismo; e taxa de difusão dos antibióticos no meio de cultura.

CULTURA DE URINA		
Material:	URINA RECENTE	
Resultado:	<i>Escherichia coli</i>	
Contagem de Colônias:	Superior a 100.000 UFC/mL	
TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIBIOGRAMA		
Antimicrobiano	Classificação/Categoria	MIC
Amicacina	Sensível	<=16
Amoxicilina-Clavulanato	Resistente	>16/8
Ampicilina	Resistente	>16
Cefalotina	Resistente	>16
Cefepime	Sensível	<=1
Cefotaxime/Ceftriaxona	Sensível	<=1
Cefuroxima	Sensível	<=8
Ciprofloxacina	Sensível	<=1
Ertapenem	Sensível	<=0.5
Fosfomicina	Sensível	<=64
Gentamicina	Sensível	<=4
Imipenem	Sensível	<=1
Levofloxacina	Sensível	<=2
Meropenem	Sensível	<=1
Nitrofurantoina	Sensível	<=32
Piperacilina-Tazobactam	Sensível	<=16
Trimetoprim-Sulfametoxazol	Resistente	>2/38

Caso não ocorra crescimento bacteriano, o antibiograma não será realizado.

Figura 3 – Laudo de um teste de sensibilidade antimicrobiana em amostra de urina recente.

ANTIBIOGRAMA (BrCast)				
<i>Staphylococcus spp.</i>				
Antibiótico	Sigla	S	I	R
Tetraciclina	TET	≥22	19-21	<19
Cefoxitina	CFO	≥22	-	<22
Azitromicina	AZI	≥21	18-20	<18
Sulfametoxazol	SUT	≥17	14-16	<14
Ciprofloxacina	CIP	≥50	21-49	<21
Linezolina	LNZ	≥21	-	<21
Gentamicina	GEN	≥18	-	<18
Ampicilina	AMP	≥18	-	<18
Eritromicina	ERI	≥21	18-20	<18
Clorofenicol	CLO	≥18	-	<18
Rifampicina	RIF	≥26	23-25	<23
Clindamicina	CLI	≥22	19-21	<19

Tabela 1 – Ponto de cortes clínicos versão 2020 para a bactéria *Staphylococcus spp.* (adaptado). S = Sensível, dose padrão; I = Sensível, aumentando exposição; R = Resistente. Disponível em: <http://brcast.org.br/>, acesso em 25 de fevereiro de 2021 as 11:58 hrs.

ANTIBIOGRAMA (BrCast)				
<i>Escherichia coli</i>				
Antibiótico	Sigla	S	I	R
Gentamicina	GEN	≥17	-	<17
Ciprofloxacina	CIP	≥25	22-24	<22
Sulfametoxazol	SUT	≥14	11 13	<11
Amoxicilina/ ác. clavulânico	AMC	≥19	-	<19
Ceftriaxona	CRO	≥25	22-24	<22
Cefepime	CPM	≥27	24-26	<24
Amicacina	AMI	≥18	-	<18
Aztreonam	ATM	≥26	21-25	<21
Piperaciclina	PIT	≥20	17-19	<17
Cefoxitina	CFO	≥19	-	<19
Ceftrazidima	CAZ	≥22	19-21	<19

Tabela 2 – Ponto de cortes clínicos versão 2020 para a bactéria *Escherichia coli* (adaptado). S = Sensível, dose padrão; I = Sensível, aumentando exposição; R = Resistente. Disponível em: <http://brcast.org.br/>, acesso em 25 de fevereiro de 2021 as 11:58 hrs.

Por melhor que seja, a técnica de disco-difusão apresenta algumas limitações: a) não é aplicável a microrganismos de crescimento lento, porque a incubação prolongada pode deteriorar o antibiótico, gerando leituras imprecisas; b) antibióticos de difusão lenta, como a polimixina B, podem apresentar grandes variações nos valores de MIC anteriormente à observação de variações significativas nos diâmetros das zonas de inibição, gerando resultados não fidedignos.

Em laboratórios cuja demanda por antibiogramas é muito grande, especialmente se houver recebimento de amostras hospitalares, a determinação da sensibilidade a antibióticos deve ser realizada rapidamente. Devido à urgência, muitos recorrem aos métodos automatizados, que consistem em um cartão ou painel com múltiplos poços. Cada poço contém o meio de cultura e um antibiótico, sendo os poços inoculados com a amostra do paciente e analisados por um equipamento que detecta o crescimento microbiano por meio da densidade óptica, conseqüentemente determinando a sensibilidade ou resistência para cada antibiótico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Módulo 5 – Teste de sensibilidade aos antimicrobianos: II – Técnicas, 3. Ágar-diluição. **Anvisa**, [s. d.]. Disponível em: https://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/mo_dulo5/agar.htm. Acesso em: 15 jan. 2021.

OPLUSTIL, C. P. *et al.* Testes de sensibilidade aos antimicrobianos. *In: OPLUSTIL, C. P. et al. Procedimentos básicos em microbiologia clínica*. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2010. Cap. 26, p. 315-356.

PEREIRA, A. F.; VERMELHO, A. B. Antibiograma. *In: VERMELHO, A. B. et al. Práticas de microbiologia*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019. Cap. 7, p. 137-153.

SILVA, C. H. P. M.; NEUFELD, P. M. Antibióticos e quimioterápicos. *In: SILVA, C. H. P. M.; NEUFELD, P. M. Bacteriologia e micologia para o laboratório clínico*. Rio de Janeiro: Revinter, 2006. Cap. 5, p. 42-57.

SILVA, C. H. P. M.; NEUFELD, P. M. Testes de susceptibilidade antimicrobiana (TSA). *In: SILVA, C. H. P. M.; NEUFELD, P. M. Bacteriologia e micologia para o laboratório clínico*. Rio de Janeiro: Revinter, 2006. Cap. 13, p. 171-222.