

Fundamento do antibiograma e CIM. Vantagens e limitações do antibiograma.

Ezequiel Albornoz

Serviço Antimicrobianos

INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



ANLIS
MALBRÁN



Organización de las Naciones
Unidas para la Alimentación
y la Agricultura



ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro



Unión Europea

TESTES de SENSIBILIDADE

Medem a resposta do crescimento de um microrganismo em presença de uma ou várias drogas

OBJETIVO

- Prever o sucesso ou o fracasso do tratamento antimicrobiano.**
- Combinadas com informação e experiência clínica deveriam permitir a escolha do antibiótico correto para o tratamento do paciente.**
- Vigilância local de resistência.**

TESTES de SENSIBILIDADE

Metodologias

1. Diluição em caldo e em ágar.
2. Método epsilométrico (E-test[®], MICE[®], MIC Test Strips[®]).
3. Equipamentos Automatizados (VITEK2C[®], MICROSCAN[®], PHOENIX[®], SENSITITRE[®]).
4. Difusão em ágar.

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



Organización de las Naciones
Unidas para la Alimentación
y la Agricultura



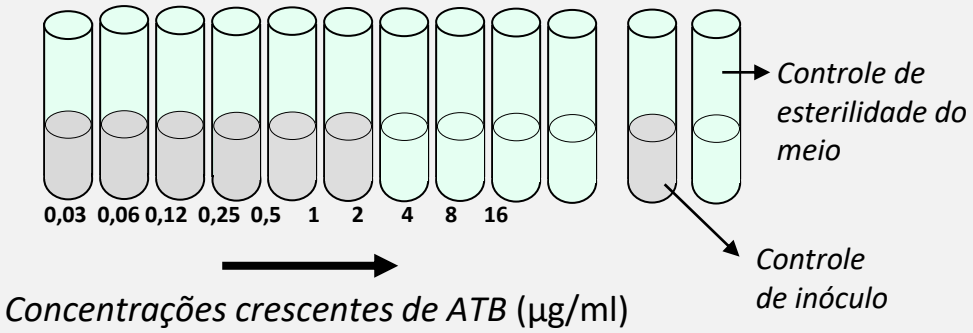
ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro



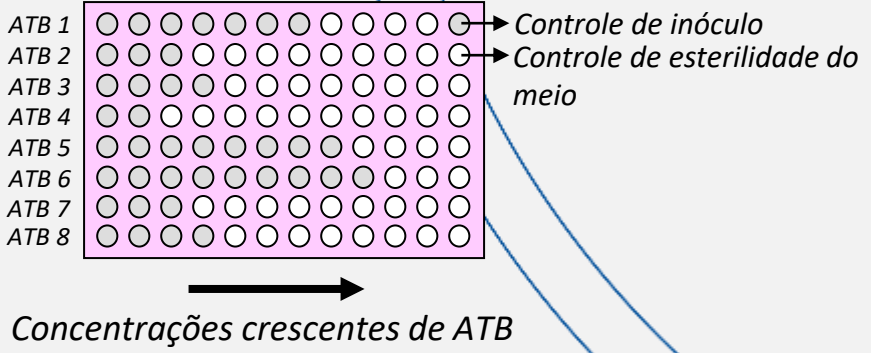
Unión Europea

1. Diluição em caldo e em ágar

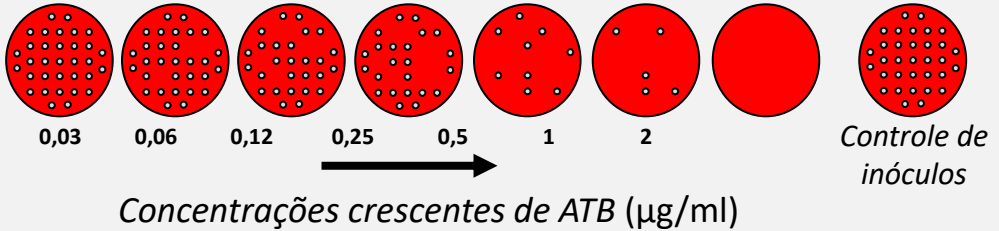
Macrodiluição em caldo



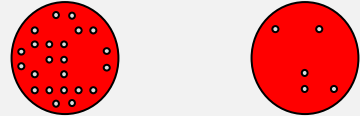
Microdiluição em caldo



Diluição em ágar

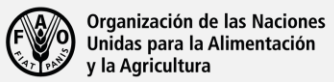


Concentração “Break-points”



CIM: concentração inibitória mínima

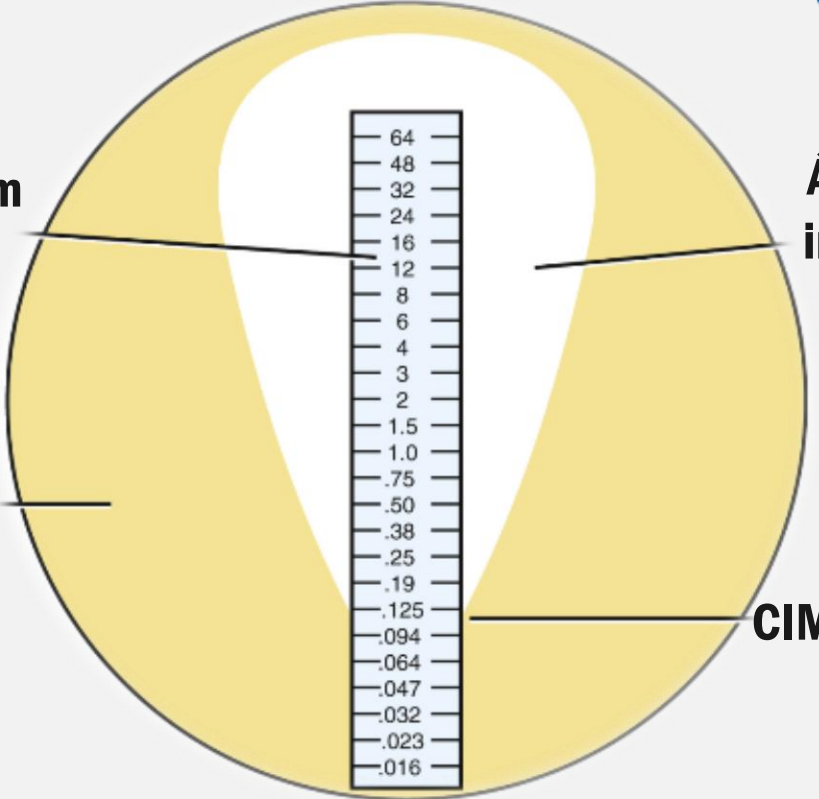
TRABAJANDO JUNTOS PARA COMBATIR LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS



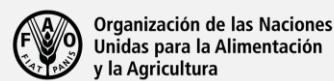
2. Método epsilométrico (E-test[®], MICE[®], MIC Test Strips[®])

Tira plástica não porosa ou de papel com um gradiente de concentrações de ATB

Crescimento bacteriano



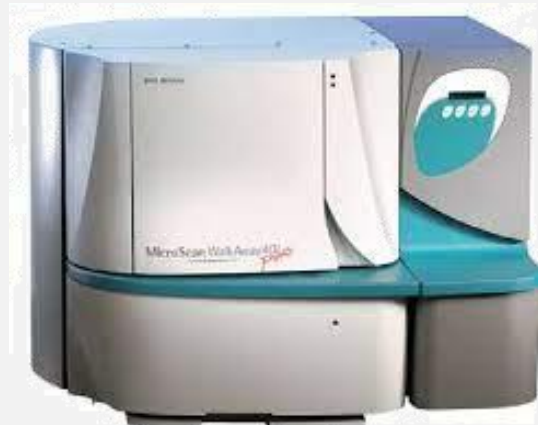
TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



3. Equipamentos Automatizados



VITEK2C®



MICROSCAN®

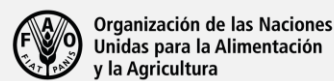


PHOENIX®

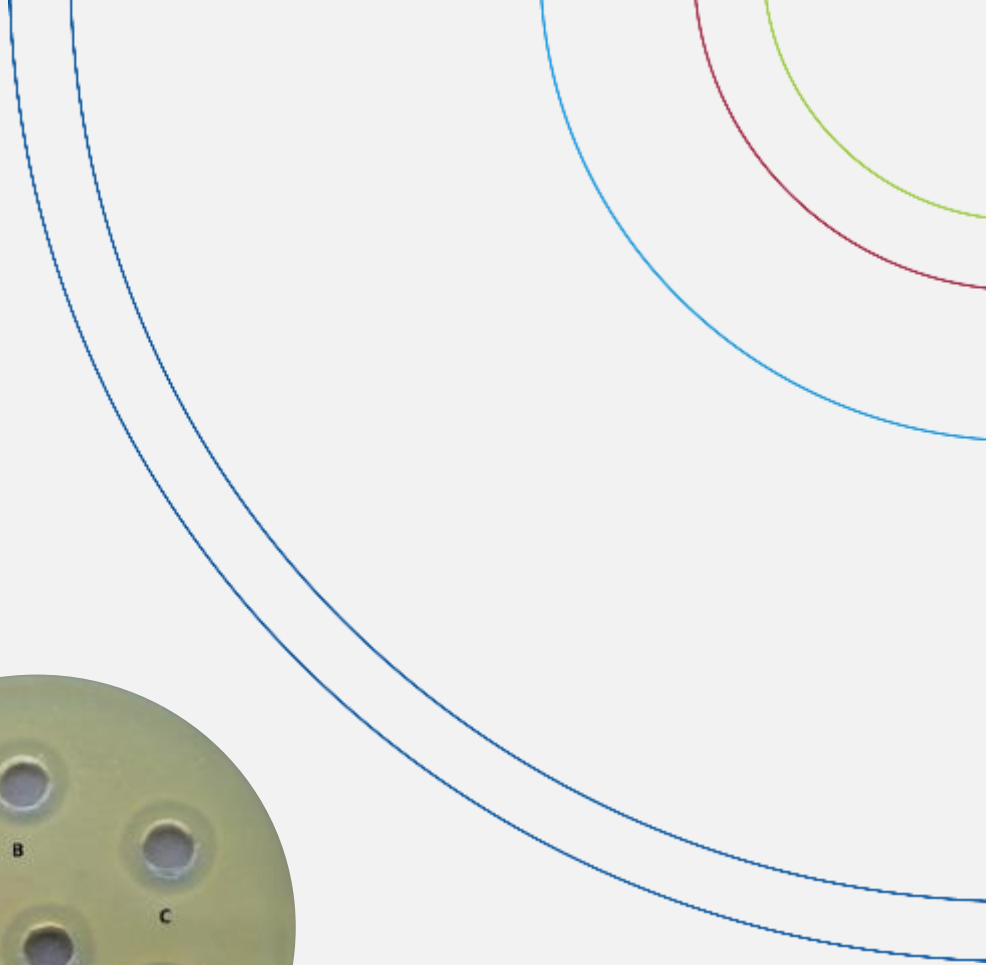
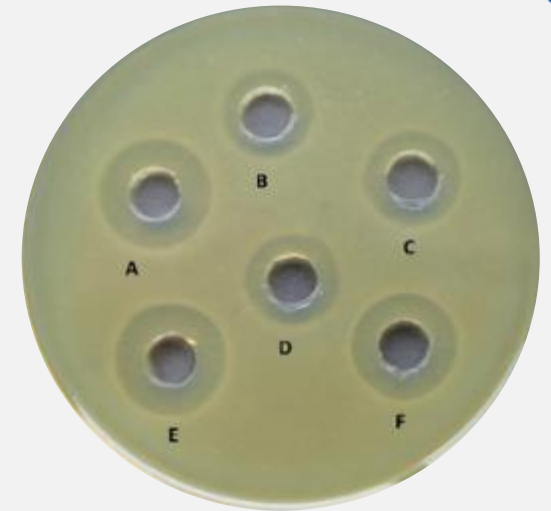


SENSITRE®

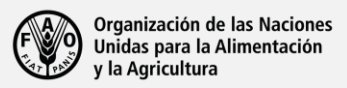
TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



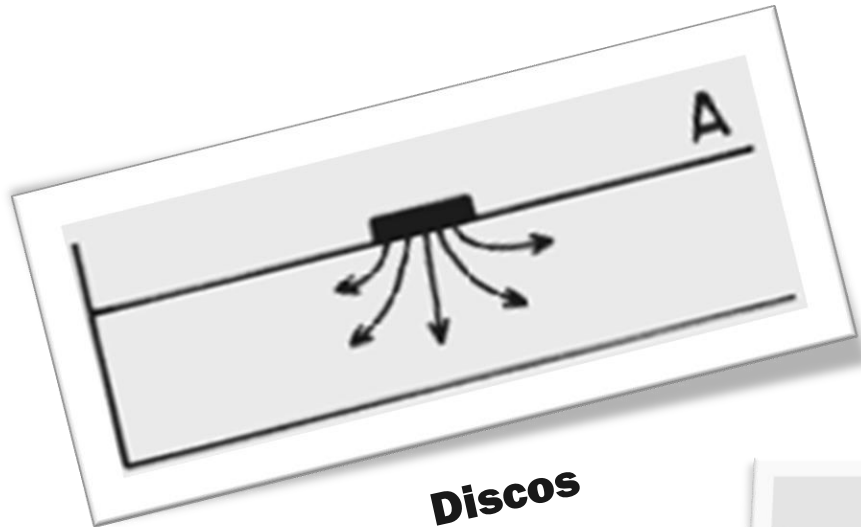
4. Difusão em Ágar



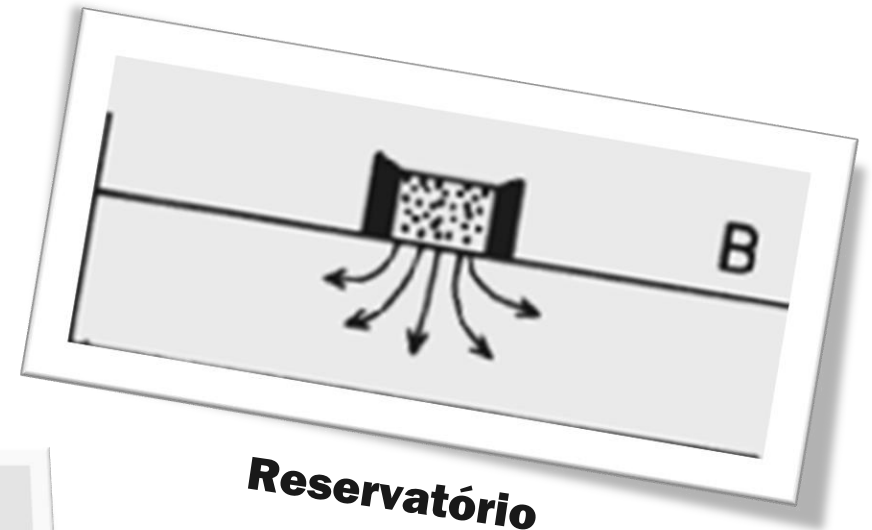
TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



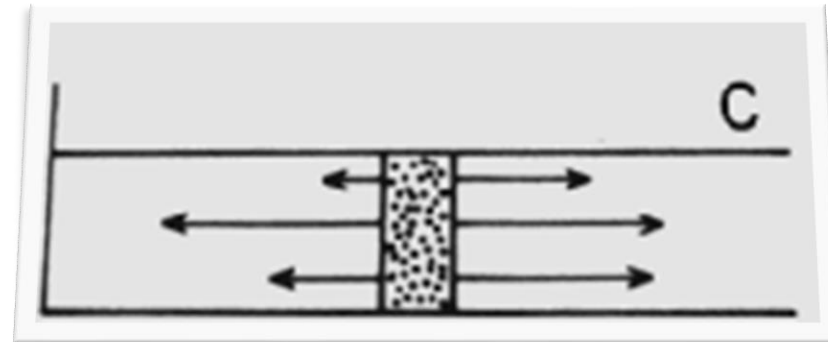
APLICAÇÃO DE ANTIBACTERIANOS SOBRE PLACAS DE ÁGAR



Discos



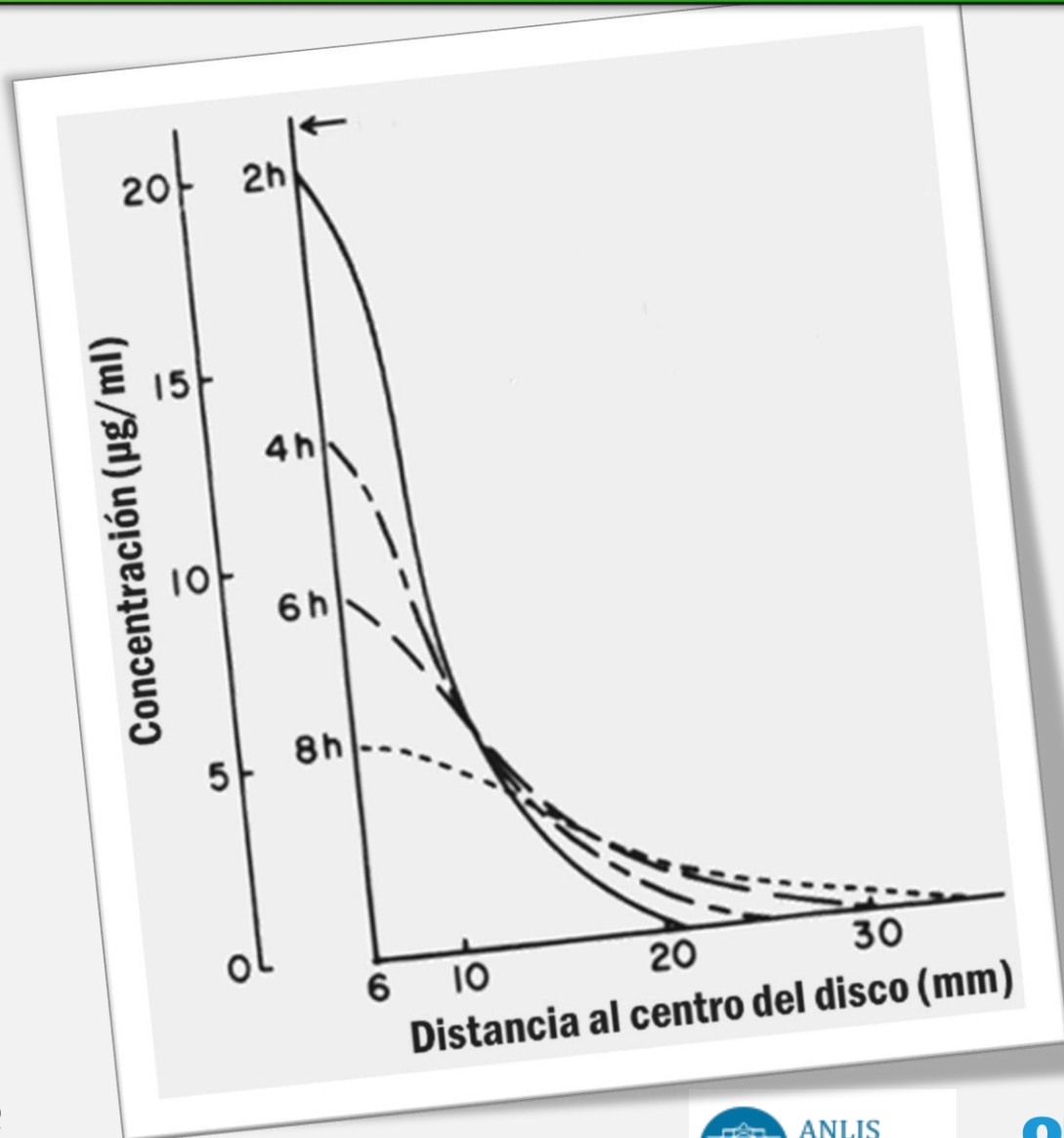
Reservatório



Orifício no ágar

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS

CINÉTICA DA DIFUSÃO DE ANTIMICROBIANOS



TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



Organización de las Naciones
Unidas para la Alimentación
y la Agricultura

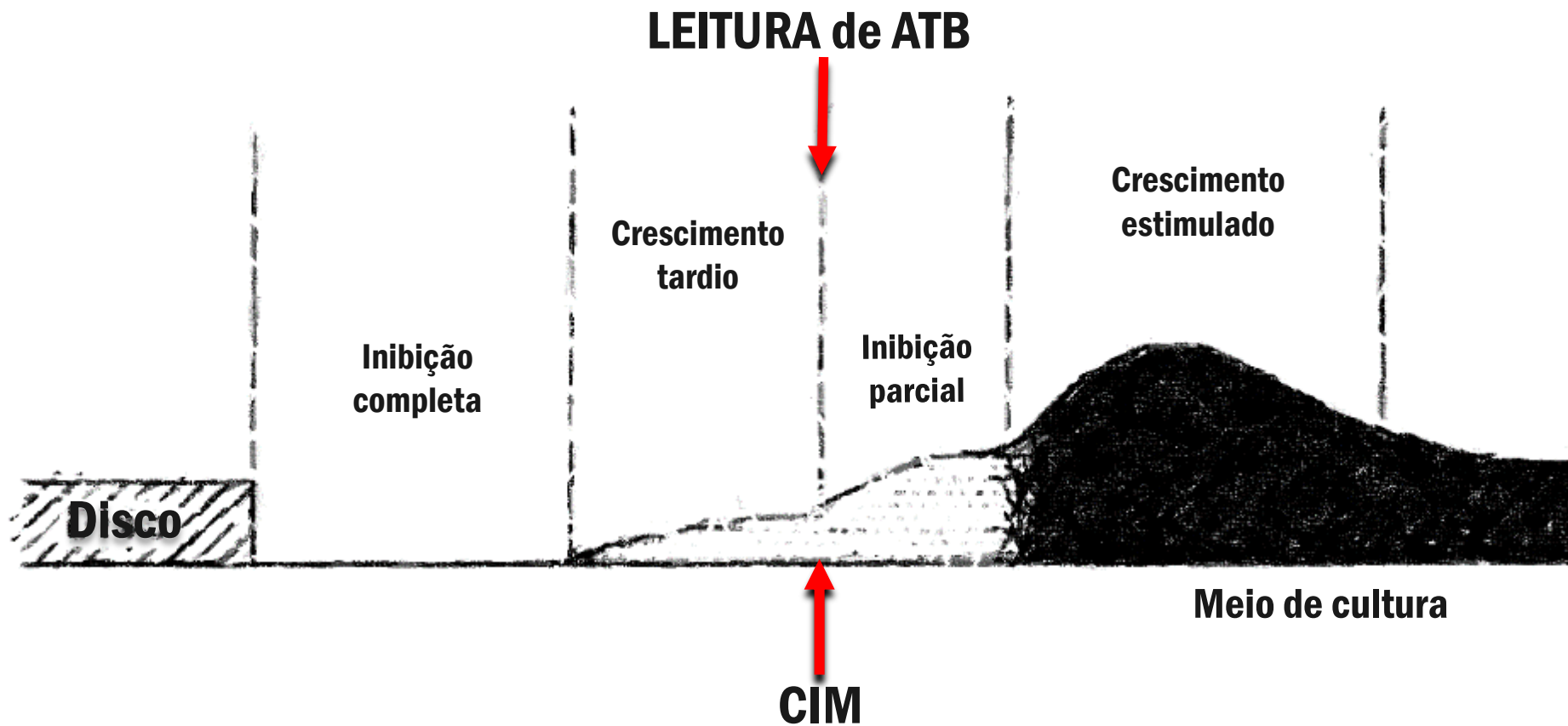


ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro



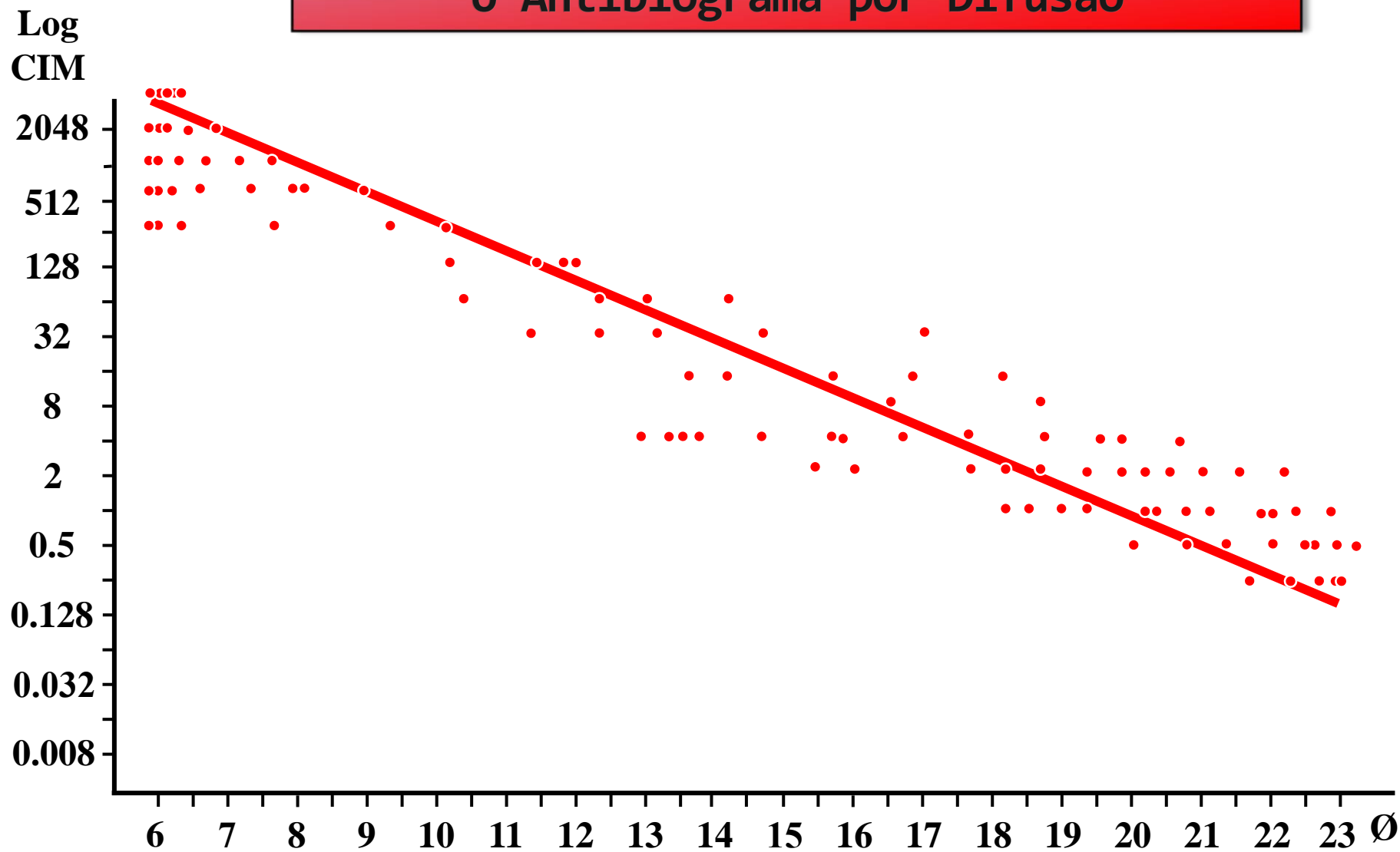
Unión Europea

Diagrama da resposta bacteriana a um gradiente de concentração de antimicrobianos

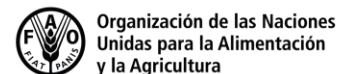


TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS

Relação entre o “gold standard” (CIM) e o Antibiograma por Difusão



TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS





CLINICAL AND
LABORATORY
STANDARDS
INSTITUTE™

M2-13^{ra} Edição: Método de difusão

Atualizam-se a cada 3 anos (2018)

M7-11^{ra} Edição: Método de diluição

M100-32^{da} Edição: Tabelas complementarias

Atualiza-se todos os anos (2022)

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



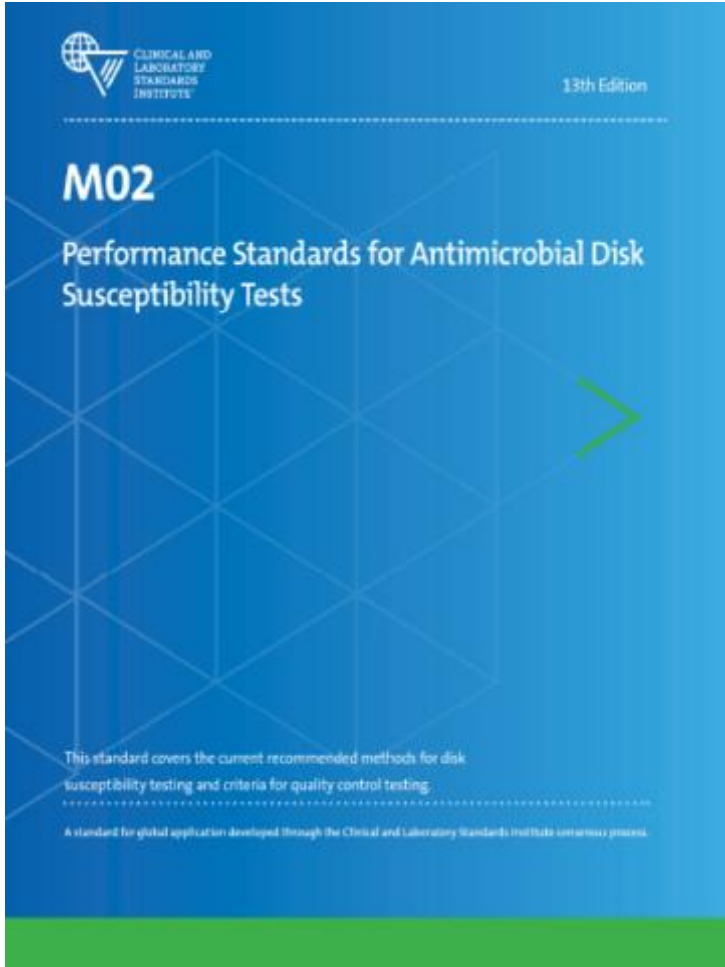
Organización de las Naciones
Unidas para la Alimentación
y la Agricultura



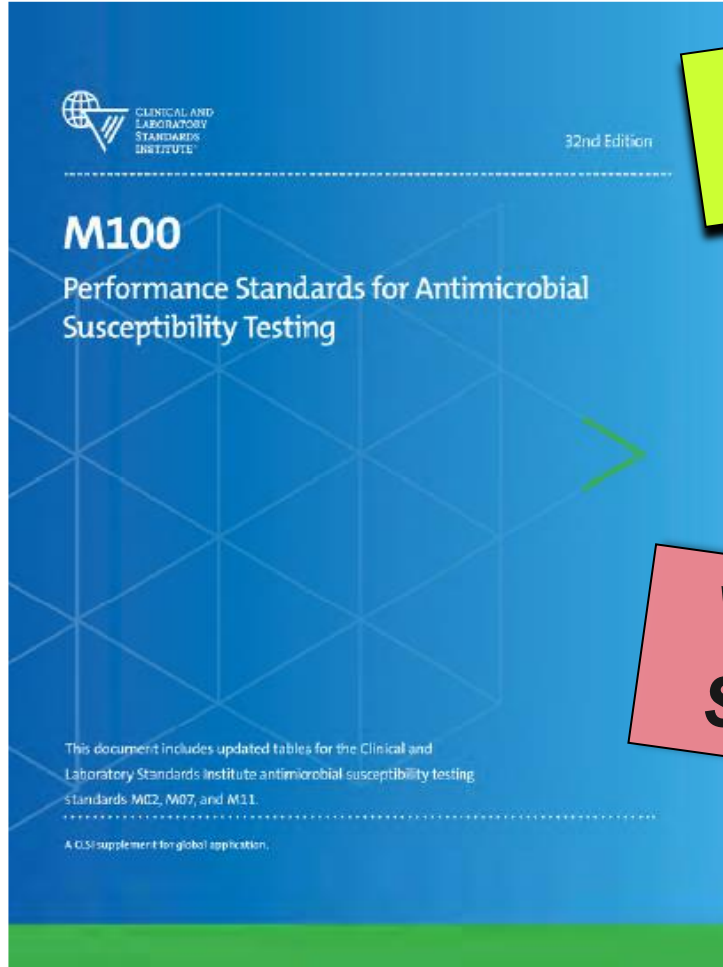
ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro



Documento M2-13º Ed. (2018)



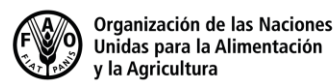
Documento M100 32º Edição



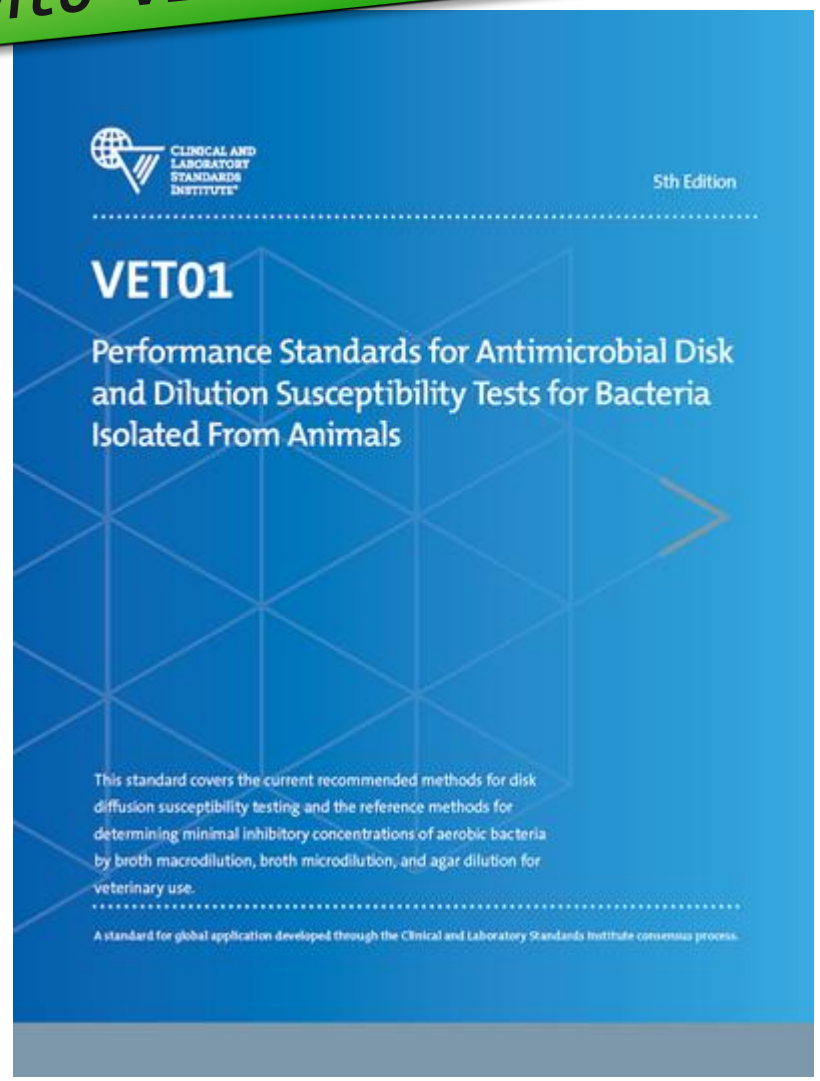
Fevereiro 2022

Vigência: Só 2022!

TRABAJANDO JUNTOS PARA COMBATIR LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS

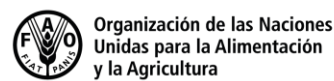
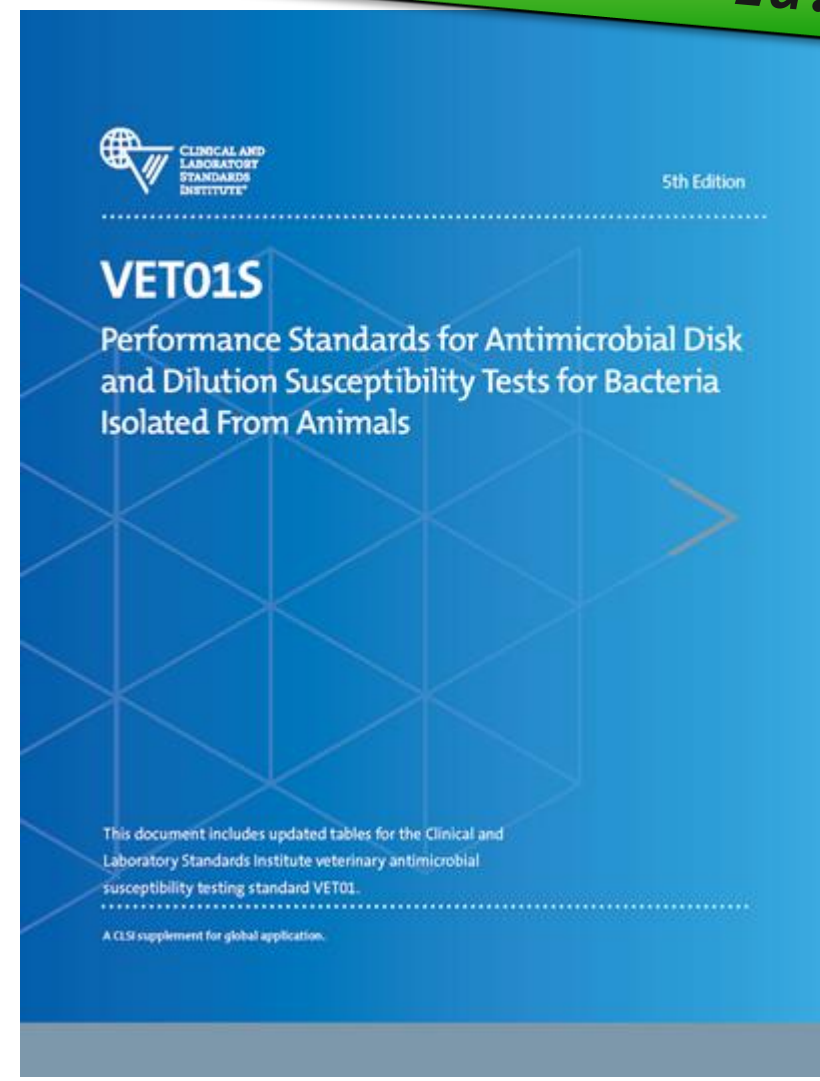


Documento VET01 5° Ed. (2018)

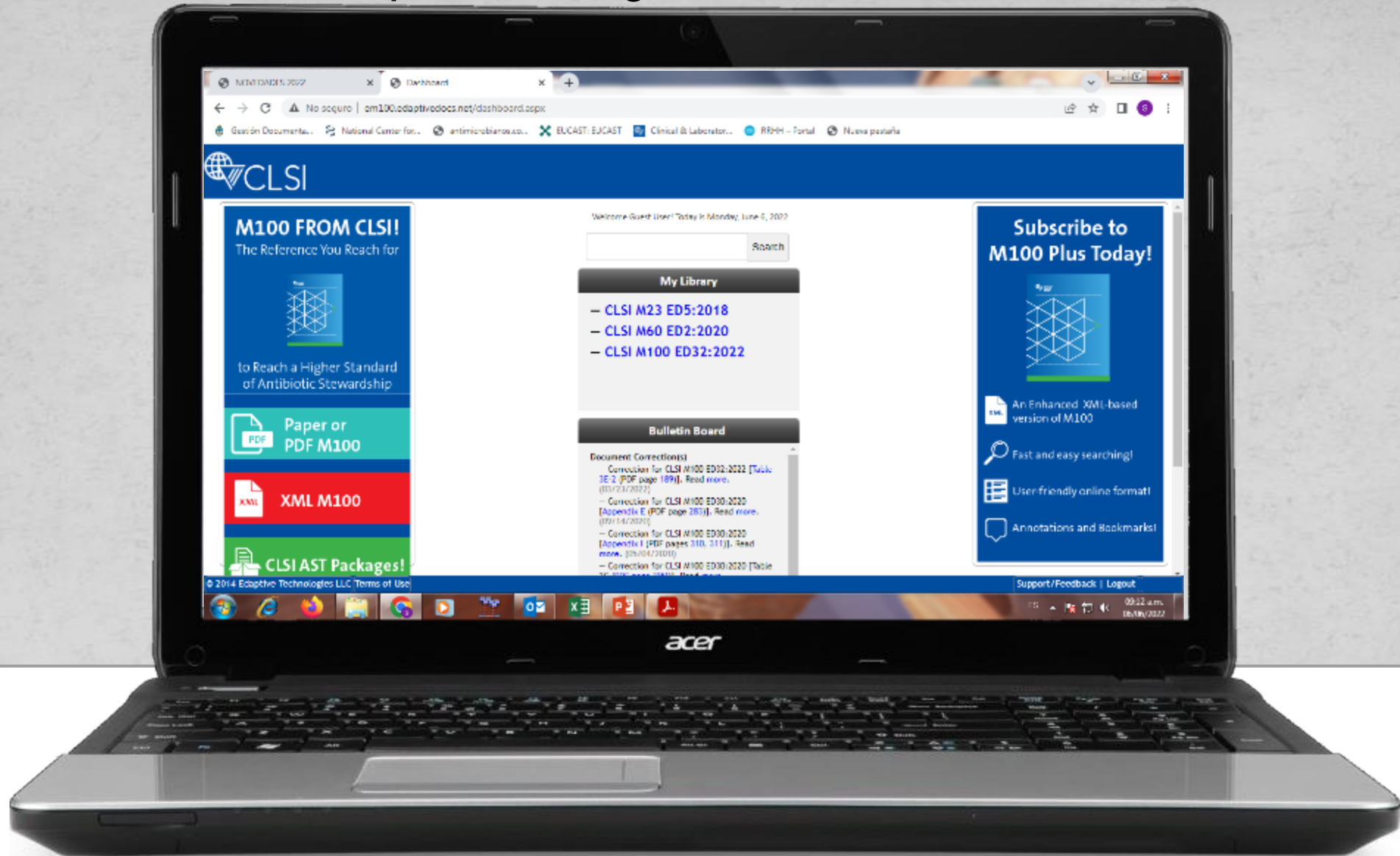


TRABAJANDO JUNTOS PARA COMBATIR LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS

Documento VET01S 5° Ed. (2020)



<https://clsi.org/all-free-resources/>



Método de Difusão por Discos

Aplicável a bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas de crescimento rápido

- ✓ Enterobacterales. (Tabela 2A, M100)
- ✓ *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. (Tabelas 2B-1 e 2B-2, M100)
- ✓ *Burkholderia cepacia* complex e *S. maltophilia* (Tabelas 2B-3 e 2B-4, M100)
- ✓ *Staphylococcus* spp. (Tabela 2C, M100)
- ✓ *Enterococcus* spp. (Tabela 2D, M100)

Com modificações:

- ✓ *Haemophilus influenzae* e *H. parainfluenzae* (Tabela 2E, M100)
- ✓ *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis* (Tabelas 2F e 2I, M100)
- ✓ *Streptococcus pneumoniae* (Tabela 2G, M100)
- ✓ *Streptococcus* spp. grupo β - hemolítico e grupo Viridans (Tabelas 2H-1 y 2H-2, M100)

-Sensível (S): o microrganismo é inibido pelas concentrações do antimicrobiano que usualmente são alcançadas quando utilizada a dosagem recomendada para o tratamento do local da infecção, o que resulta em uma provável eficácia clínica.

-Intermédio (I): isolamentos com CIMs ou diâmetros de área de inibição que conseguem níveis geralmente alcançáveis de droga no sangue e tecidos, e/ou cujas taxas de resposta possam ser mais baixas que para isolamentos sensíveis. Esta categoria também inclui uma área buffer que contempla a variabilidade inerente ao método e deveria prevenir que fatores técnicos pequenos e não controlados ocasionem grandes discrepâncias na interpretação, especialmente para drogas com margem estreita de farmacotoxicidade.

-Resistente (R): o microrganismo não é inibido pelas concentrações do antimicrobiano que usualmente são alcançadas quando utilizada a dosagem normal e/ou apresenta CIMs ou diâmetros de área de inibição dentro do intervalo no qual são prováveis os mecanismos de resistência, e a eficácia clínica do antimicrobiano contra o microrganismo não foi demonstrada de forma confiável em estudos clínicos.

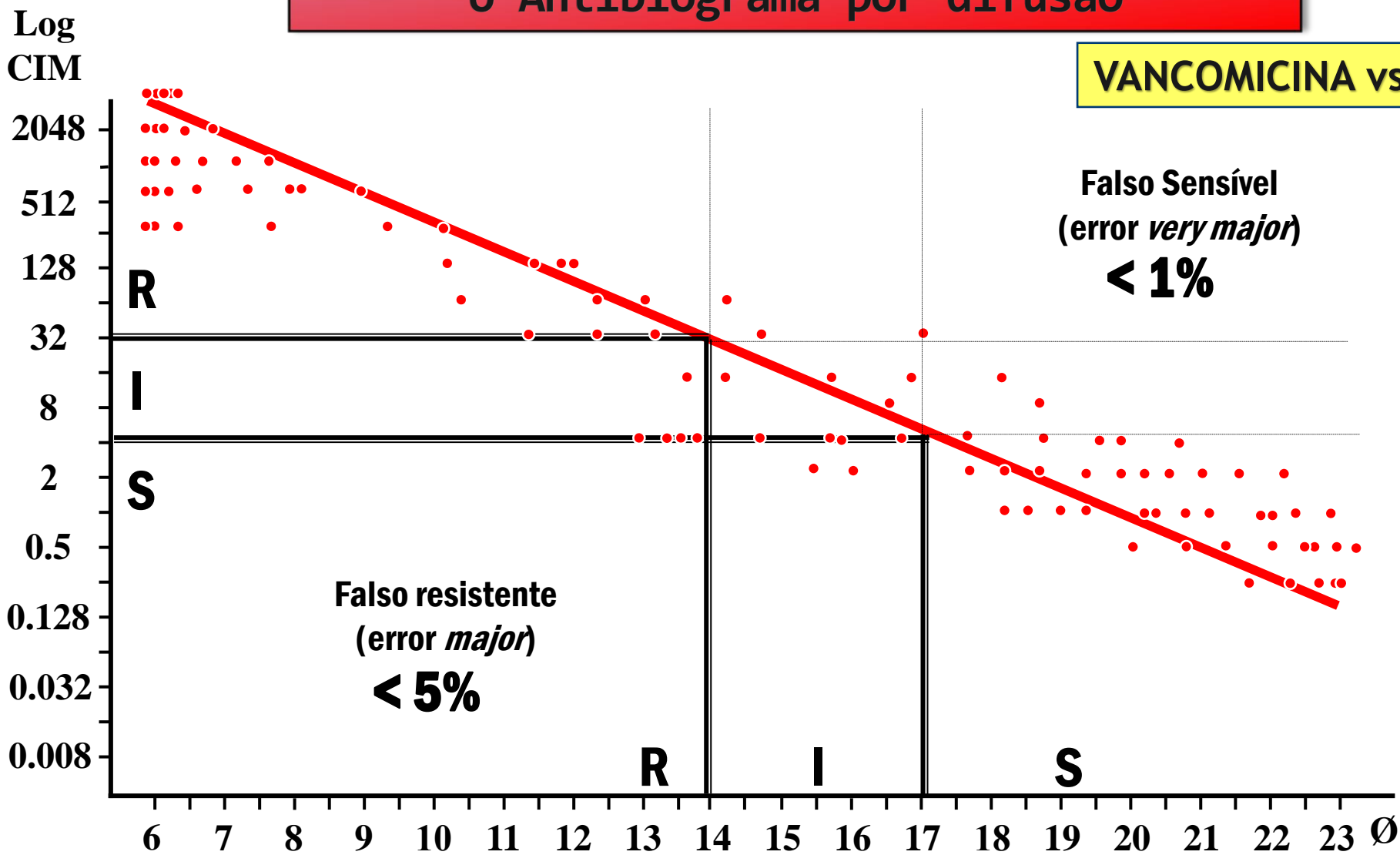
Categorias de Interpretación

- **Não Sensível (NS)**: Aplica-se para microrganismos que tem somente categoria “S”, devido à ausência ou baixa frequência de cepas resistentes. Os isolamentos com CIMs maiores ou áreas de inibição menores ao BP de “S”, devem ser informados como “Não Sensíveis”. “NS” não significa necessariamente que exista um mecanismo de resistência. É provável que cepas com CIMs acima do ponto de corte de sensibilidade encontrem-se dentro da distribuição selvagem. Para cepas com resultados na categoria “NS” deveria ser confirmada a identificação do organismo e os testes de sensibilidade.
- **Sensível dependente da dose (SDD)**: A sensibilidade de um isolamento é dependente do regime de dosagem utilizado. Quando os testes de sensibilidade (CIM ou difusão) determinem que a categoria de interpretação é SDD será necessário utilizar um regime de dosagem que resulte em uma maior exposição à droga que o utilizado para estabelecer os pontos de corte.

Sempre considerando o máximo regime de dosagem aprovado.

Relação entre o "gold standard" (CIM) e o Antibiograma por difusão

VANCOMICINA vs *Enterococcus* spp.



TRABAJANDO JUNTOS PARA COMBATIR LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS

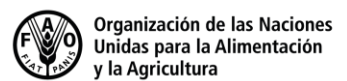


Table 2A
Enterobacteriaceae
M02 and M07Table 2A. Zone Diameter and MIC Breakpoints for *Enterobacteriaceae*

| Testing Conditions | | Routine QC Recommendations (see Tables 4A-1 and 5A-1 for acceptable QC ranges) |
|--------------------|---|---|
| Medium: | Disk diffusion: MHA Broth dilution: CAMHB Agar dilution: MHA | <i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853 (for carbapenems) |
| Inoculum: | Broth culture method or colony suspension, equivalent to a 0.5 McFarland standard | Refer to Tables 4A-2 and 5A-2 to select strains for routine QC of β-lactam combination agents. |
| Incubation: | 35°C \pm 2°C; ambient air Disk diffusion: 16–18 hours Dilution methods: 16–20 hours | When a commercial test system is used for susceptibility testing, refer to the manufacturer's instructions for QC test recommendations and QC ranges. |

ATCC® is a registered trademark of the American Type Culture Collection.

Refer to Tables 3A, 3B, and 3C for additional testing, reporting, and QC for *Enterobacteriaceae*.

General Comments

- (1) For disk diffusion, test a maximum of 12 disks on a 150-mm plate and no more than 6 disks on a 100-mm plate; disks should be placed no less than 24 mm apart, center to center (see M02,¹ Subchapter 3.6). Each zone diameter should be clearly measurable; overlapping zones prevent accurate measurement. Measure the diameter of the zones of complete inhibition (as judged by the unaided eye), including the diameter of the disk. Hold the Petri plate a few inches above a black background illuminated with reflected light. The zone margin should be considered the area showing no obvious, visible growth that can be detected with the unaided eye. Ignore faint growth of tiny colonies that can be detected only with a magnifying lens at the edge of the zone of inhibited growth. Strains of *Proteus* spp. may swarm into areas of inhibited growth around certain antimicrobial agents. With *Proteus* spp., ignore the thin veil of swarming growth in an otherwise obvious zone of growth inhibition. With trimethoprim and the sulfonamides, antagonists in the medium may allow some slight growth; therefore, disregard slight growth (20% or less of the lawn of growth) and measure the more obvious margin to determine the zone diameter.
- (2) When fecal isolates of *Salmonella* and *Shigella* spp. are tested, only ampicillin, a fluoroquinolone, and trimethoprim-sulfamethoxazole should be reported routinely. In addition, for extraintestinal isolates of *Salmonella* spp., a 3rd-generation cephalosporin should be tested and reported, and chloramphenicol may be tested and reported if requested. Susceptibility testing is indicated for typhoidal *Salmonella* (*S. Typhi* and *S. Paratyphi A–C*) isolated from extraintestinal and intestinal sources. Routine susceptibility testing is not indicated for nontyphoidal *Salmonella* spp. isolated from intestinal sources. In contrast, susceptibility testing is indicated for all *Shigella* isolates.
- (3) The dosage regimens shown in the comments column below are those needed to achieve plasma drug exposures (in adults with normal renal and hepatic functions) on which breakpoints were based. When implementing new breakpoints, it is strongly recommended that laboratories share this information with infectious diseases practitioners, pharmacists, pharmacy and therapeutics committees, infection control committees, **and the antimicrobial stewardship team.**

NOTE: Information in boldface type is new or modified since the previous edition.

Table 2A
Enterobacterales
M02 and M07

Table 2A. Enterobacterales (Continued)

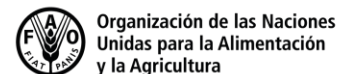
| Test/Report Group | Antimicrobial Agent | Disk Content | Interpretive Categories and Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm | | | | Interpretive Categories and MIC Breakpoints, µg/mL | | | | Comments |
|------------------------------------|-------------------------|--------------|---|-----|--------|------|--|-----|--------|---------|--|
| | | | S | SDD | I | R | S | SDD | I | R | |
| PENICILLINS | | | | | | | | | | | |
| A | Ampicillin | 10 µg | ≥ 17 | - | 14-16* | ≤ 13 | ≤ 8 | - | 16* | ≥ 32 | (6) Results of ampicillin testing can be used to predict results for amoxicillin. See general comment (2). |
| O | Piperacillin | 100 µg | ≥ 21 | - | 18-20* | ≤ 17 | ≤ 16 | - | 32-64* | ≥ 128 | |
| O | Mecillinam | 10 µg | ≥ 15 | - | 12-14* | ≤ 11 | ≤ 8 | - | 16* | ≥ 32 | (7) For testing and reporting of <i>E. coli</i> urinary tract isolates only. |
| B-LACTAM COMBINATION AGENTS | | | | | | | | | | | |
| B | Amoxicillin-clavulanate | 20/10 µg | ≥ 18 | - | 14-17* | ≤ 13 | ≤ 8/4 | - | 16/8* | ≥ 32/16 | |
| B | Ampicillin-sulbactam | 10/10 µg | ≥ 15 | - | 12-14* | ≤ 11 | ≤ 8/4 | - | 16/8* | ≥ 32/16 | |
| B | Ceftolozane-tazobactam | 30/10 µg | ≥ 21 | - | 18-20* | ≤ 17 | ≤ 2/4 | - | 4/4* | ≥ 8/4 | (8) Breakpoints are based on a dosage regimen of 1.5 g administered every 8 h. |
| B | Ceftazidime-avibactam | 30/20 µg | ≥ 21 | - | - | ≤ 20 | ≤ 8/4 | - | - | ≥ 16/4 | (9) Breakpoints are based on a dosage regimen of 2.5 g every 8 h administered over 2 h. (10) Confirmatory MIC testing is indicated for isolates with zones of 20-22 mm to avoid reporting false-susceptible or false-resistant results. |
| B | Imipenem-relebactam | 10/25 µg | ≥ 25 | - | 21-24* | ≤ 20 | ≤ 1/4 | - | 2/4* | ≥ 4/4 | (11) Breakpoints are based on a dosage regimen of 1.25 g administered every 6 h. (12) Breakpoints do not apply to the family <i>Morganellaceae</i> , which includes but is not limited to the genera <i>Morganella</i> , <i>Proteus</i> , and <i>Providencia</i> . (13) Organisms that test susceptible to imipenem are also considered susceptible to imipenem-relebactam. However, organisms that test susceptible to imipenem-relebactam cannot be assumed to be susceptible to imipenem. |

Enterobacterales:

Tabelas: M100 CLSI
32ª Edição (2022)

- TABELA 3A: Teste para β -lactamases de espectro estendido em *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* e *P. mirabilis*.
- TABELA 3B: Teste de Carba NP para Enterobacterales e *P. aeruginosa* suspeitas de produção de carbapenemase.
- TABELA 3B-1: Modificações de Tabela 3B utilizando pontos de corte para carbapenemes de M100-S20, janeiro 2010.
- TABELA 3C: Método de Inativação de Carbapenem modificado (mCIM) para Enterobacterales e *P. aeruginosa* suspeitas de produção de carbapenemase.
- TABELA 3C-1: Modificações de Tabela 3C utilizando pontos de corte para carbapenemes de M100-S20, janeiro 2010.
- TABELA 3D: Teste para detecção de resistência a colistina em Enterobacterales e *P. aeruginosa*.
- TABELA 3E: Teste para realizar Difusão por Discos diretamente de hemocultura positiva.

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



Staphylococcus spp.:

Tabelas: M100 CLSI
32ª Edição (2022)

- TABELA 3F: Teste para detecção de produção de β -lactamase em *Staphylococcus* spp.
- TABELA 3G-1: Teste para detecção de Meticilina resistência (resistência a oxacilina) em *S. aureus* e *S. lugdunensis*.
- TABELA 3G-2: Teste para detecção de Meticilina resistência (resistência a oxacilina) em *Staphylococcus* spp. excepto *S. aureus* e *S. lugdunensis*.
- TABELA 3H: Screening para detecção de CIM ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ de Vancomicina em *S. aureus* e *Enterococcus* spp.
- TABELA 3I: Teste para detecção de resistência induzível a clindamicina em *Staphylococcus* spp, *S. pneumoniae* e *Streptococcus* spp grupo β -hemolítico.
- TABELA 3J: Teste para detecção de alto nível de resistência a mupirocina em *S. aureus*.

Enterococcus spp.:

- TABELA 3K: Teste para detecção de alto nível de resistência a aminoglicosídeo em *Enterococcus* spp.

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



Organización de las Naciones
Unidas para la Alimentación
y la Agricultura

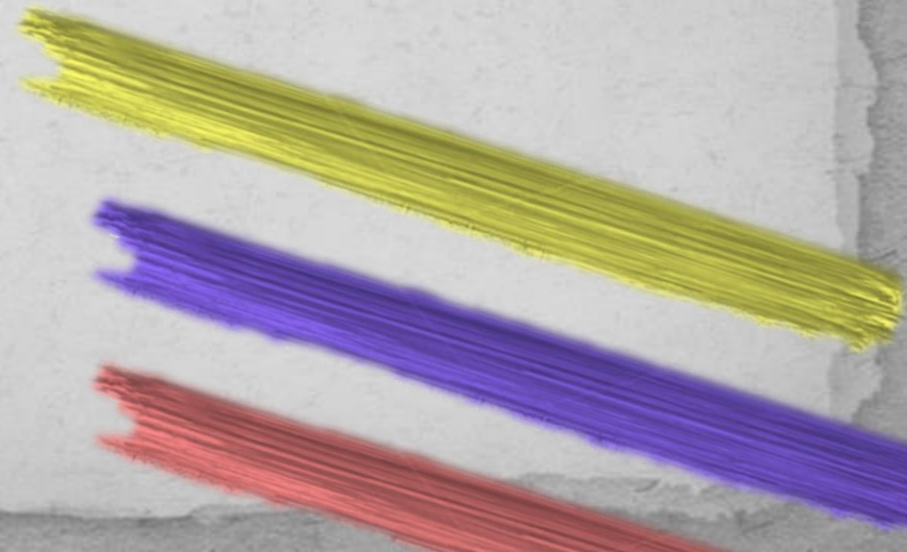


ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro



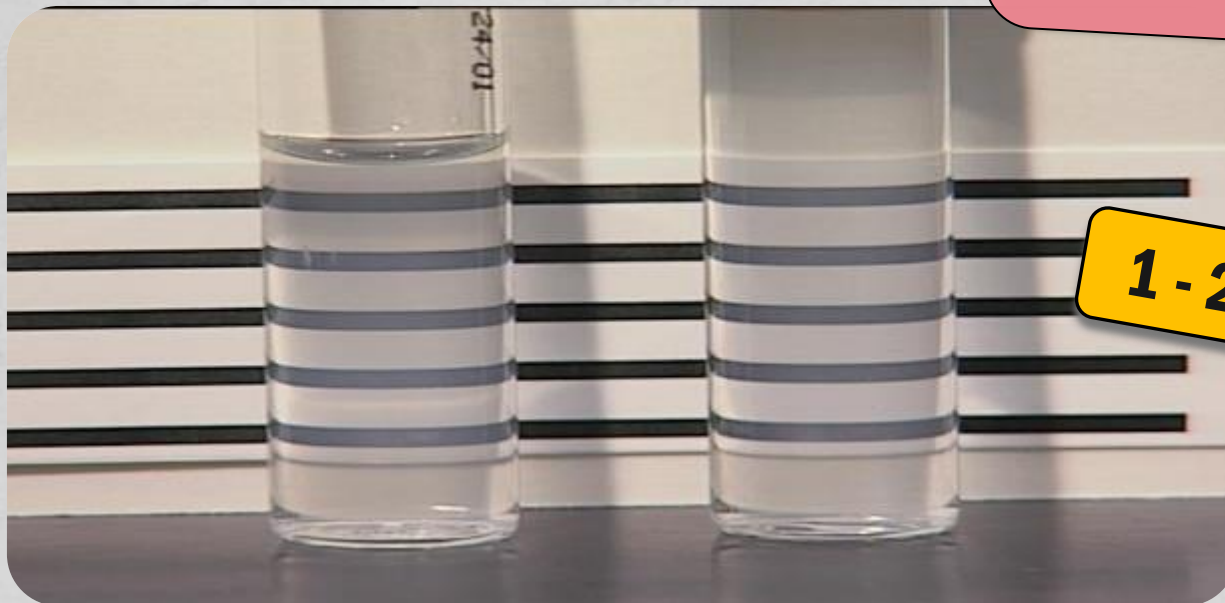
Método de Difusão por Discos

- 1. Preparação e padronização do inóculo.**
- 2. Inoculação de placas.**
- 3. Aplicação de discos.**
- 4. Incubação.**
- 5. Medida das áreas de inibição.**
- 6. Interpretação de resultados.**
- 7. Controle de qualidade.**



1. Padronização do inóculo

PADRÃO DE TURBIDEZ
0.5 da ESCALA Mc.
FARLAND:



1 - 2 x 10⁸ UFC/ml

0,5 ml BaCl₂ 1.175% + 99,5 ml de H₂SO₄ 1%
(Absorbância a 625 nm: 0.08 a 0.10)

1. Preparação do inóculo padronizado: 0.5 da ESCALA Mc. FARLAND

MÉTODO de SUSPENÇÃO de COLÔNIA:

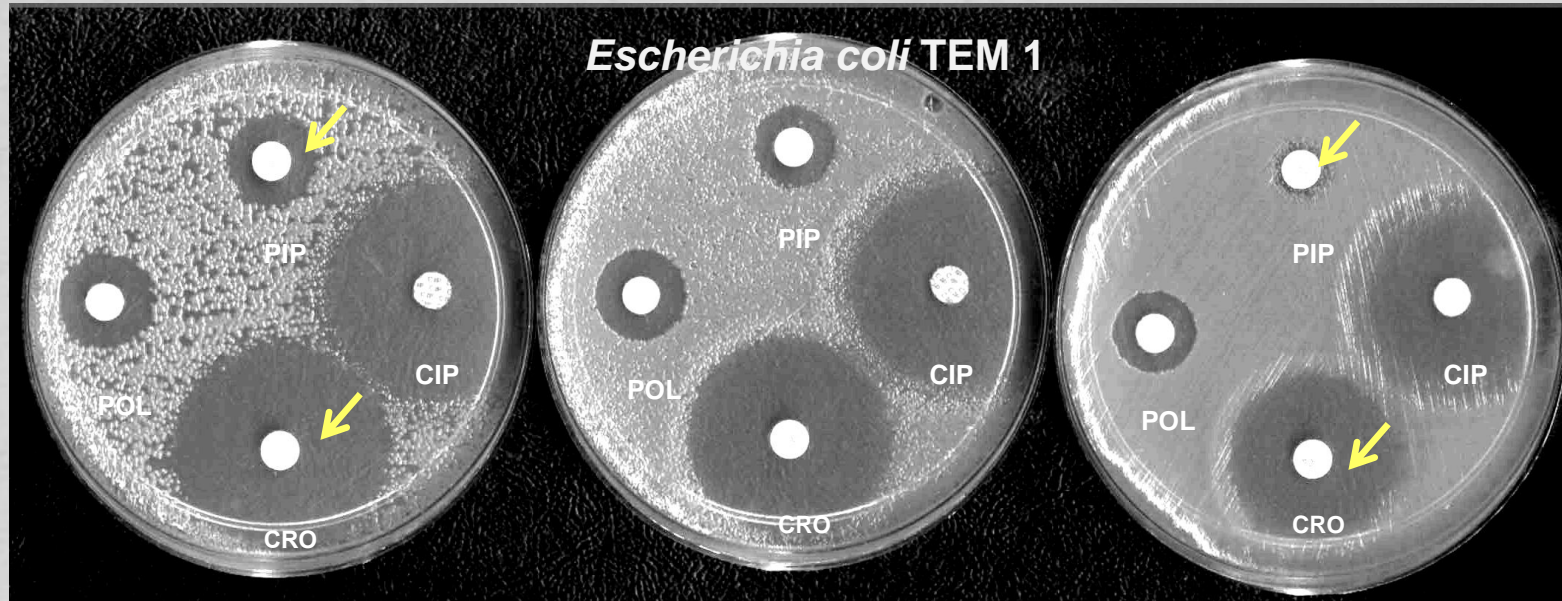
- Cepas com 18-24h de incubação.
- *Staphylococcus* spp. e detecção de Meticilina-Resistência
- Microorg. fastidiosos : *S. pneumoniae* , *Streptococcus* spp.,
Haemophilus spp., *N. gonorrhoeae* e
N. meningitidis.



MÉTODO de CULTURA em CALDO:

- Dispõe-se de poucas colônias.
- Cepas com mais de 24 horas de incubação.
- Bactérias com dificuldade para obter suspensões homogêneas.

EFEITO INÓCULO



0,25 Mc Farland
 7×10^7 UFC/ml

0,5 Mc Farland
 1.5×10^8 UFC/ml

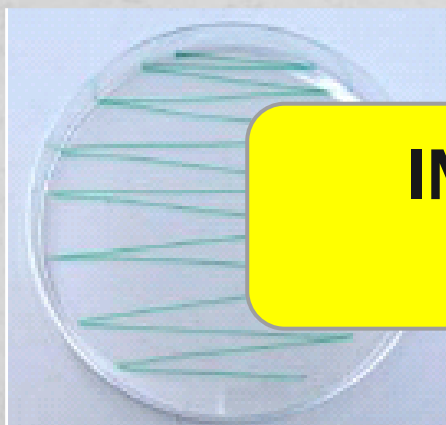
1 Mc Farland
 3×10^8 UFC/ml

2. Inoculação das placas

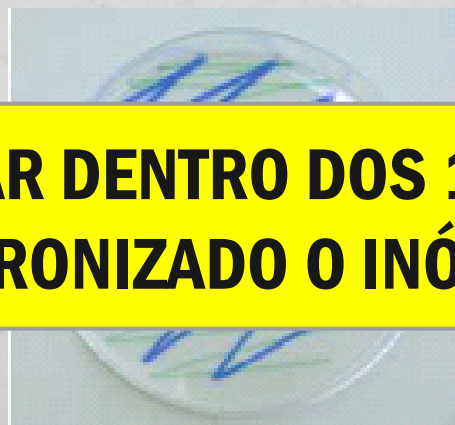
- ✓ Ágar Mueller Hinton (MH)
- ✓ Ágar MH + 5% sangue de carneiro, HTM, etc.
- ✓ pH 7.2 – 7.4
- ✓ Profundidade das placas: 4mm



Esfregar em três direções



Esfregar



Rotar 60°, esfregar



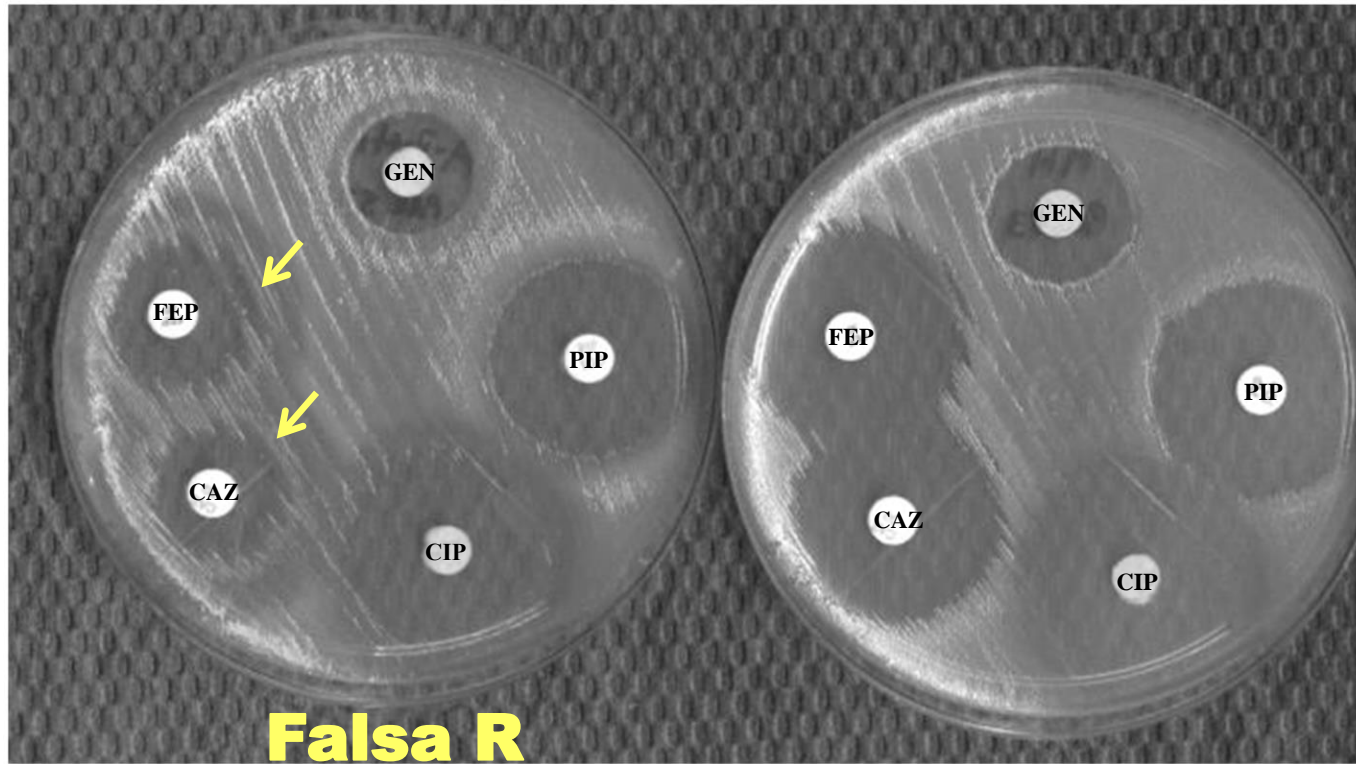
Rotar 60°, esfregar

**INOCULAR DENTRO DOS 15 min. DE
PADRONIZADO O INÓCULO**

Variação no meio de cultura
***P. aeruginosa* ATCC 27853**

Ágar BHI

Ágar MH



3. Aplicação de discos

- ✓ **Verificar o vencimento.**
- ✓ **Evitar humidade.**
- ✓ **Conservar a 4°C ou menos.**
- ✓ **Não usar mais de 6 discos por placa de 100mm.**
- ✓ **Não usar mais de 12 discos por placa de 150 mm.**

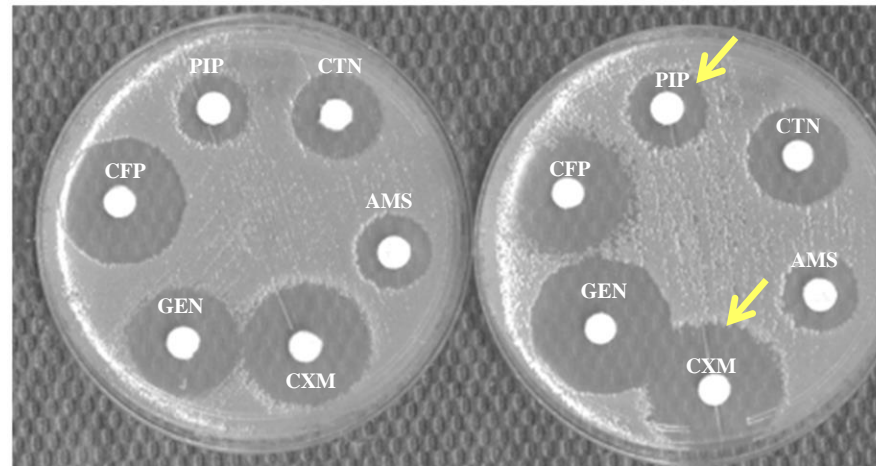


**APLICAR OS DISCOS DENTRO DOS 15 min
POSTERIORES À INOCULAÇÃO**

Variação no tempo de colocação dos discos

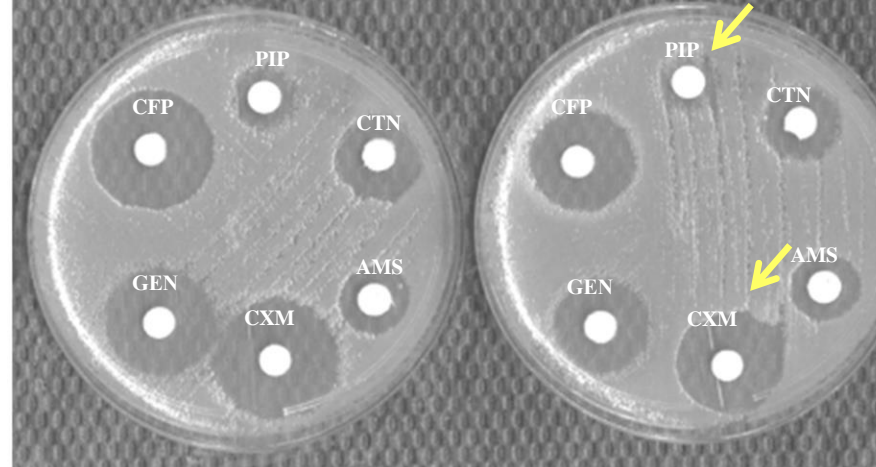
Escherichia coli ATCC 35218

1h



0h

2h



3h

Falsa R (a maior demora na colocação)

4. Incubação de placas



Temperatura: $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$
Ambiente: com ou sem CO_2
Tempo: 16-18 ou 24h

**INCUBAR AS PLACAS DENTRO DOS 15 min DE
COLOCADOS OS DISCOS**

Efeito da Temperatura de Incubação *Staphylococcus* spp. e Meticilina Resistência

Table 2C
Staphylococcus spp.
M02 and M07

Table 2C. Zone Diameter and MIC Breakpoints for *Staphylococcus* spp.

| Testing Conditions | | Routine QC Recommendations (see Tables 4A-1 and 5A-1 for acceptable QC ranges) | |
|--|---|--|------------------------------|
| Medium: | Disk diffusion: MHA Broth dilution: CAMHB; CAMHB + 2% NaCl for oxacillin; CAMHB supplemented to 50 µg/mL calcium for daptomycin Agar dilution: MHA; MHA + 2% NaCl for oxacillin. Agar dilution has not been validated for daptomycin. | Disk diffusion: | <i>S. aureus</i> ATCC® 25923 |
| Inoculum: | Colony suspension, equivalent to a 0.5 McFarland standard | Dilution methods: | <i>S. aureus</i> ATCC® 29213 |
| Incubation: | 35°C ± 2°C; ambient air Disk diffusion: 16–18 hours; 24 hours (CoNS and ceftiofloxacin) Dilution methods: 16–20 hours; 24 hours for oxacillin and vancomycin. | When a commercial test system is used for susceptibility testing, refer to the manufacturer's instructions for QC test recommendations and QC ranges. | |
| Testing at temperatures above 35°C may not detect MRS. | | | |

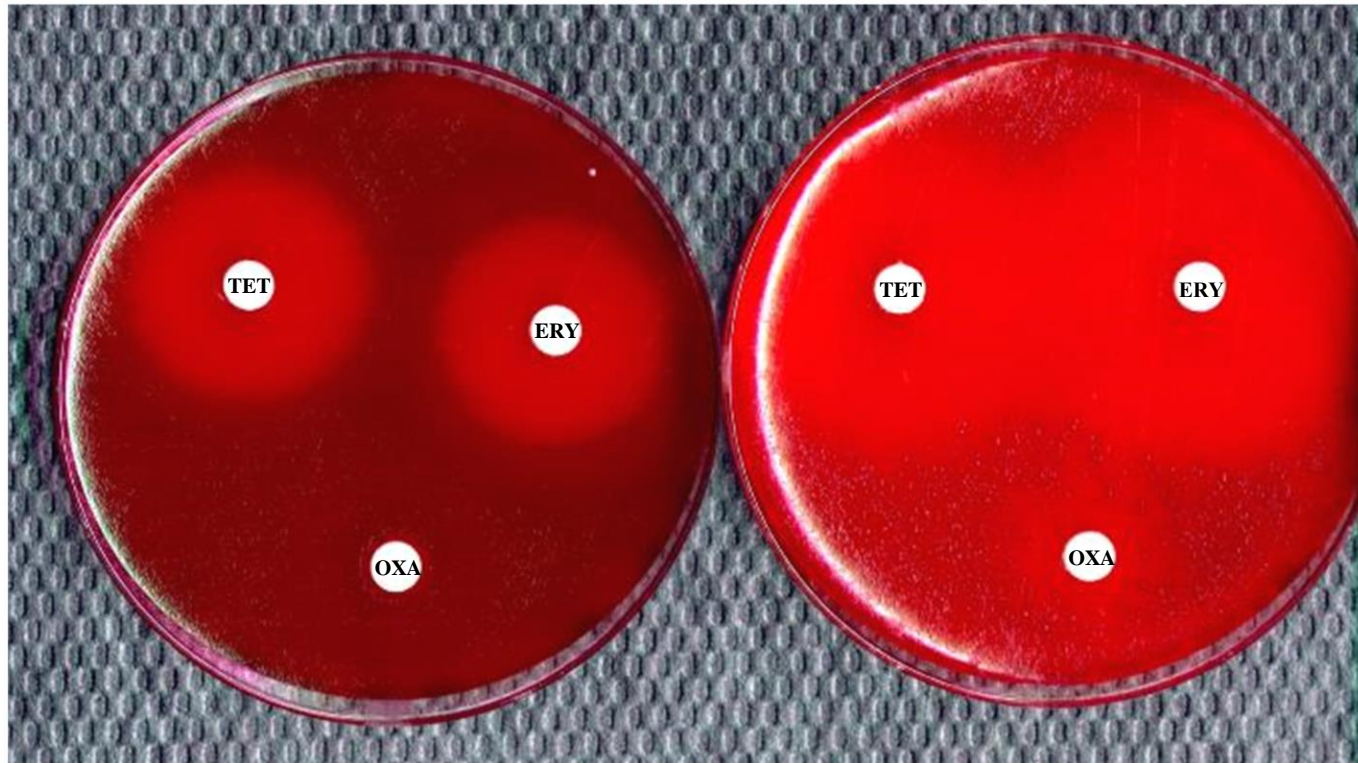
* ATCC® is a registered trademark of the American Type Culture Collection.

General Comments

- (1) For disk diffusion, test a maximum of 12 disks on a 150-mm plate and no more than 6 disks on a 100-mm plate; disks should be placed no less than 24 mm apart, center to center (see M02,¹ Subchapter 3.6). Each zone diameter should be clearly measurable; overlapping zones prevent accurate measurement. Measure the diameter of the zones of complete inhibition (as judged by the unaided eye), including the diameter of the disk. Hold the Petri plate a few inches above a black background illuminated with reflected light, except for linezolid, which should be read with transmitted light (plate held up to light source). The zone margin should be considered the area showing no obvious, visible growth that can be detected with the unaided eye. Ignore faint growth of tiny colonies that can be detected only with a magnifying lens at the edge of the zone of inhibited growth. With trimethoprim and the sulfonamides, antagonists in the medium may allow some slight growth; therefore, disregard slight growth (20% or less of the lawn of growth) and measure the more obvious margin to determine the zone diameter. For linezolid, any discernible growth within the zone of inhibition is indicative of resistance to the respective agent.
- (2) For staphylococci when testing chloramphenicol, clindamycin, erythromycin, linezolid, tedizolid, and tetracycline by broth microdilution MIC, trailing growth can make end-point determination difficult. In such cases, read the MIC at the lowest concentration where the trailing begins. Tiny buttons of growth should be ignored (see M07,² Figures 3 and 4). With trimethoprim and the sulfonamides, antagonists in the medium may allow some slight growth; therefore, read the end point at the concentration in which there is ≥ 80% reduction in growth as compared to the control (see M07,² Figure 5).
- (3) Historically, resistance to the penicillinase-stable penicillins (see Glossary 1) has been referred to as "methicillin resistance" or "oxacillin resistance." MRSA are those strains of *S. aureus* that express *mecA* or another mechanism of methicillin resistance, such as changes in affinity of penicillin-binding proteins for oxacillin (modified *S. aureus* strains).

Os testes a temperaturas superiores a 35°C podem não detectar a Meticilina Resistência em Estafilococos

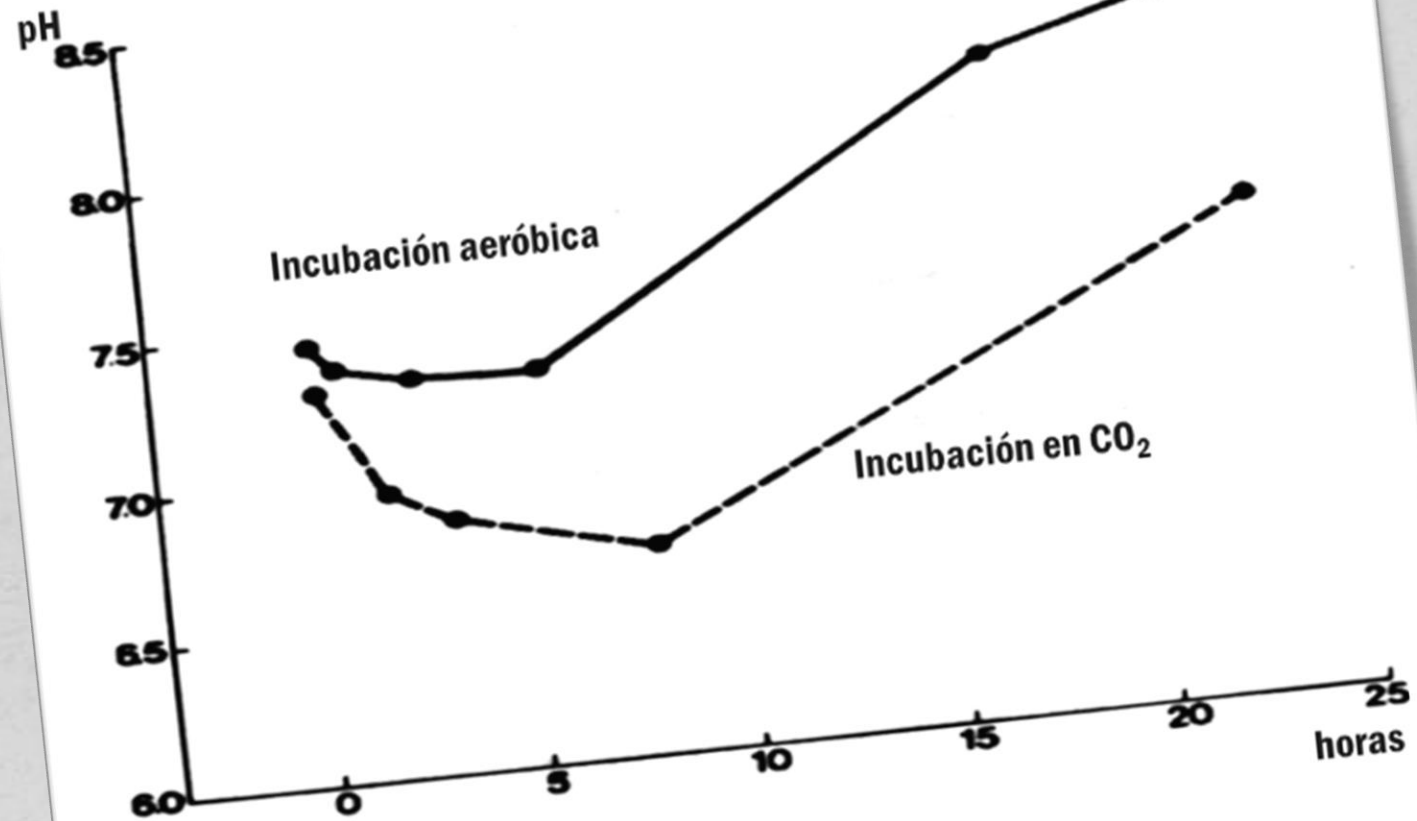
Variação na atmosfera de incubação
***Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619**



CO₂

Ar

Condições de incubação e pH do ágar



Casos particulares nos quais a leitura do antibiograma é feito às 24 horas:

-*Staphylococcus aureus* (Tabela 3H): MUPIROCINA.

-*Staphylococcus* spp., excluindo *S. aureus*, *S. lugdunensis*, *S. pseudintermedius* e *S. schleiferi* (Tabela 2C): CEFOXITINA.

-*Enterococcus* spp. (Tabela 2D): VANCOMICINA.

Table 3H
Test for High-Level Mupirocin Resistance in *Staphylococcus aureus*

Table 3H. Test for Detection of High-

| Test | |
|-----------------------------|--|
| Test method | |
| Organism group | <i>S. aureus</i> |
| Medium | MHA |
| Antimicrobial concentration | 200-µg mupirocin |
| Inoculum | Standard disc |
| Incubation conditions | 35°C ± 2°C; aerobic |
| Incubation length | 24 hours |
| Results | Examine carefully for light growth visible around the disc. No zone = high-level mupirocin resistance. Any zone = not high-level mupirocin resistance. |

Table 2C. Zone Diameter and MIC Breakpoints for *Staphylococcus* spp.

Testing Conditions

Medium: Disk diffusion: MHA
Broth dilution: CAMHB; CAMHB + CAMHB supplemented to 50 µg/r
Agar dilution: MHA; MHA + 2% NaCl; has not been validated for daptomycin

Inoculum: Colony suspension, equivalent to standard

Incubation: 35°C ± 2°C; ambient air
Disk diffusion: 16–18 hours; 24 h
Dilution methods: 16–20 hours, 24 hours for oxacillin and vancomycin
Testing at temperatures above 30°C

Table 2C
Staphylococcus spp.
M02 and M07

Table 2D
Enterococcus spp.
M02 and M07

Table 2D. Zone Diameter and MIC Breakpoints for *Enterococcus* spp.

Testing Conditions

Medium: Disk diffusion: MHA
Broth dilution: CAMHB; CAMHB supplemented to 50 µg/mL calcium for daptomycin
Agar dilution: MHA; agar dilution has not been validated for daptomycin

Inoculum: Broth culture method or colony suspension, equivalent to a 0.5 McFarland standard

Incubation: 35°C ± 2°C; ambient air
Disk diffusion: 16–18 hours
Dilution methods: 16–20 hours
All methods: 24 hours for vancomycin

Routine QC Recommendations (see Tables 4A-1 and 5A-1 for acceptable QC ranges)

Disk diffusion:
S. aureus ATCC® 25923

Dilution methods:
E. faecalis ATCC® 29212

When a commercial test system is used for susceptibility testing, refer to the manufacturer's instructions for QC test recommendations and QC ranges.

5. Medida das áreas de inibição

- ✓ Crescimento confluyente
- ✓ Áreas de inibição uniformes e circulares

2018

 QUICK GUIDE
M02QG, 1st ed.



Disk Diffusion Reading Guide

6. Interpretação de resultados

- ✓ Documento M2-13º Ed. CLSI (2018)
- ✓ Tabelas M100 CLSI (2022)

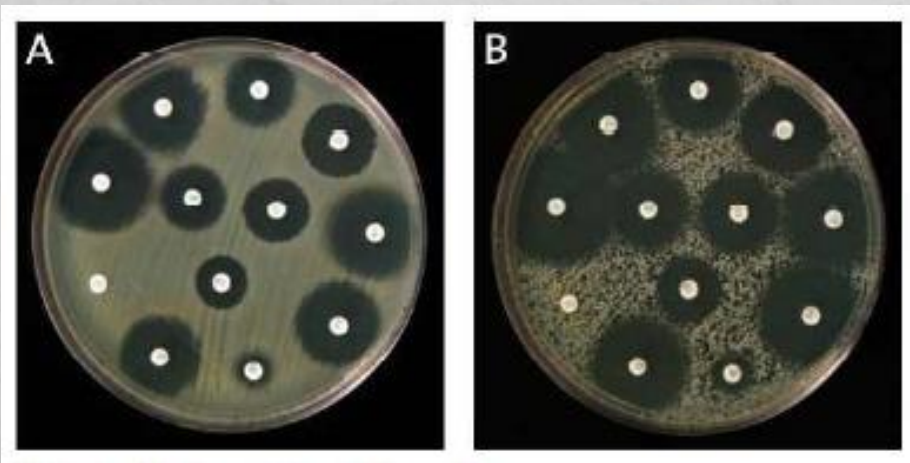
Medida das áreas de inibição

«Deverá ser considerada a área que não mostre desenvolvimento obvio a olho nu, não incluindo velo de crescimento ou pequenas colônias que possam ser detectadas só com muita dificuldade no limite da área de inibição»

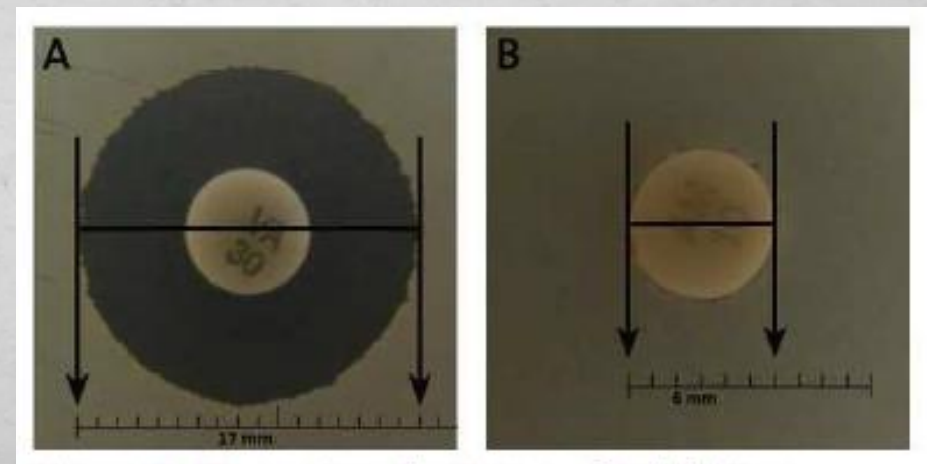
M02QG, 1º Ed.(2018)

Regras Gerais para a Medida de Áreas de Inibição

1. AVALIAR O CRESCIMENTO

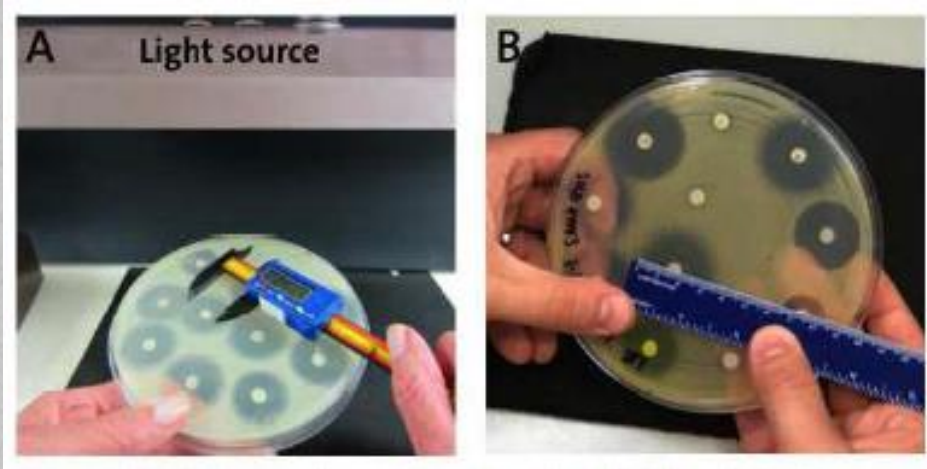


2. MEDIDA DA ÁREA DE INIBIÇÃO

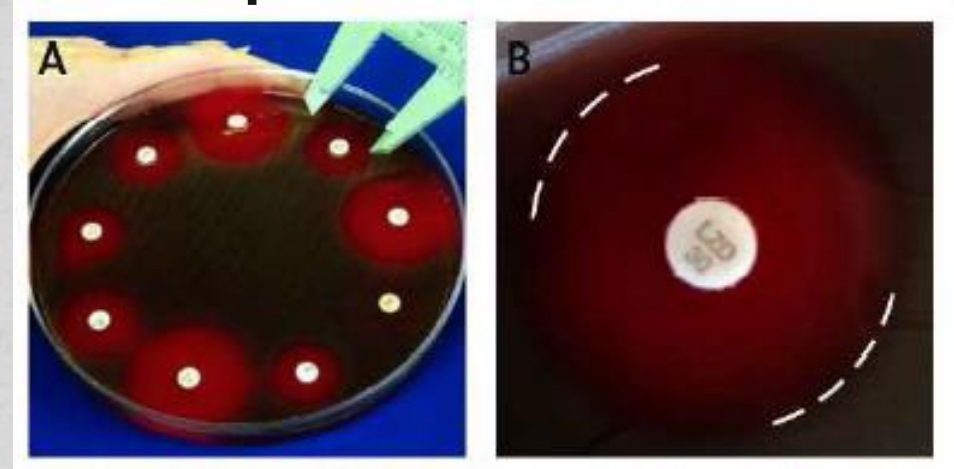


MEDIDA DA ÁREA DE INIBIÇÃO COM LUZ REFLETIDA

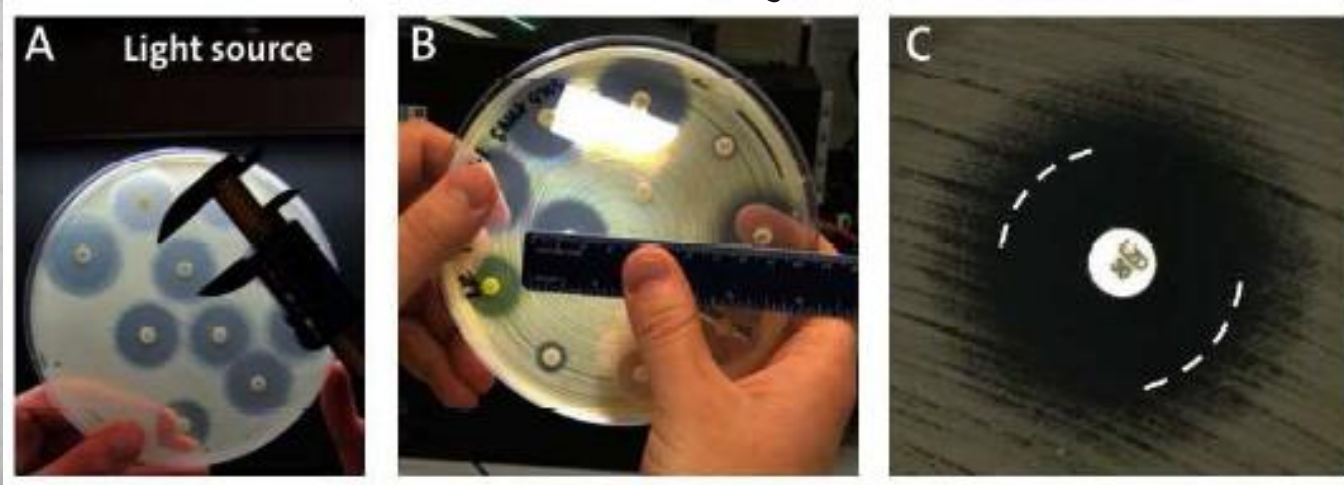
3. Meio translúcido



4. Meio opaco



5. MEDIDA DA ÁREA DE INIBIÇÃO COM LUZ TRANSMITIDA

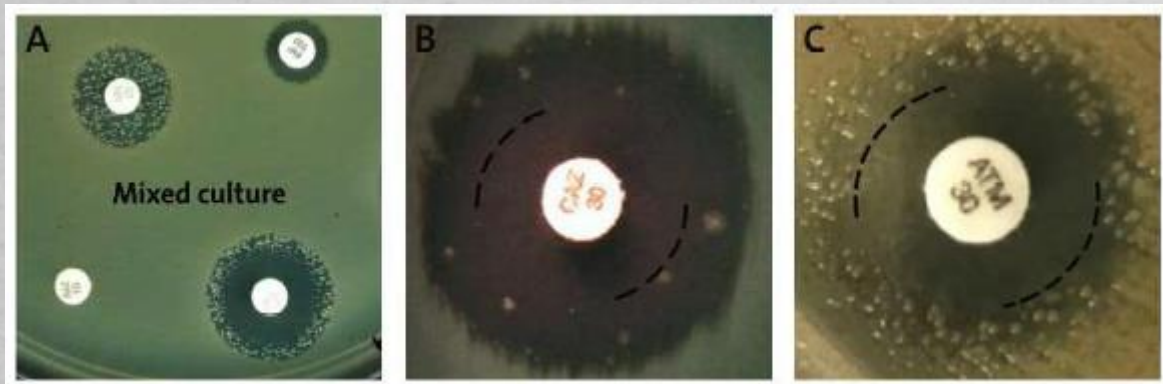


***-Staphylococcus* spp.:** linezolid (Tabela 2C) e mupirocina (Tabela 3H)

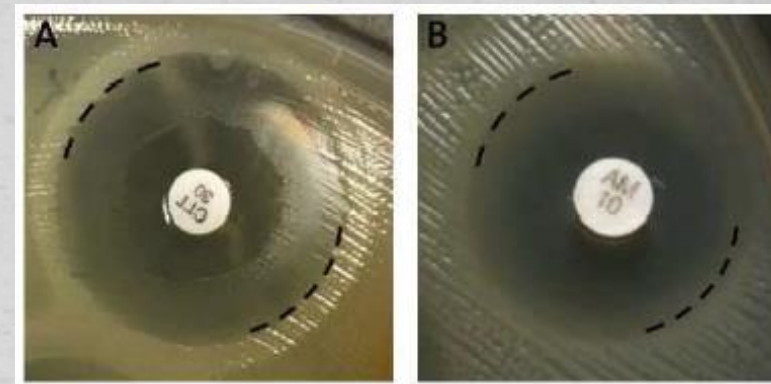
***-Enterococcus* spp.:** vancomicina (Tabela 2D)

Medida de Áreas de Inibição em Situações Especiais

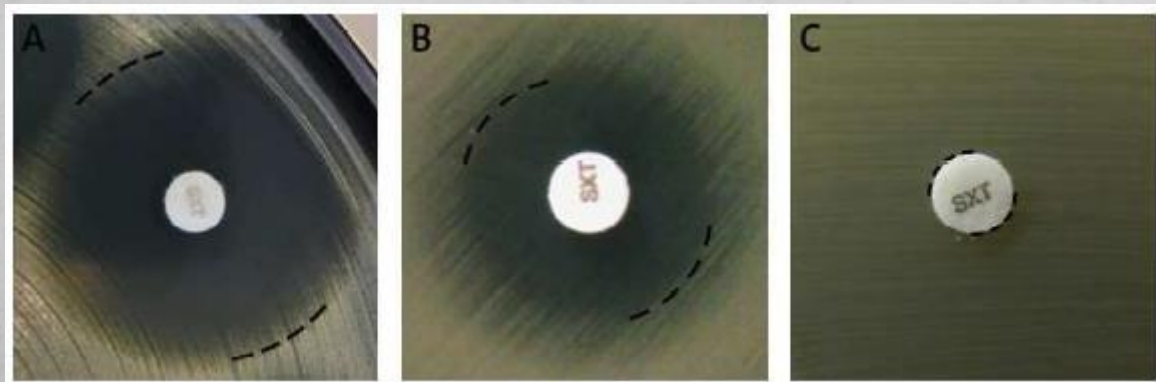
6. COLÔNIAS DENTRO DO HALO DE INIBIÇÃO



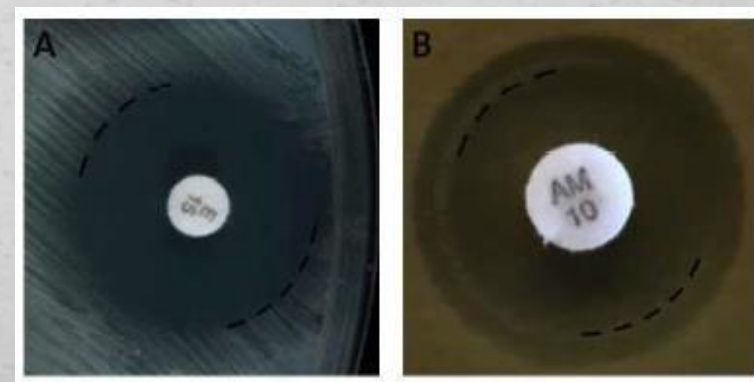
8. SWARMING



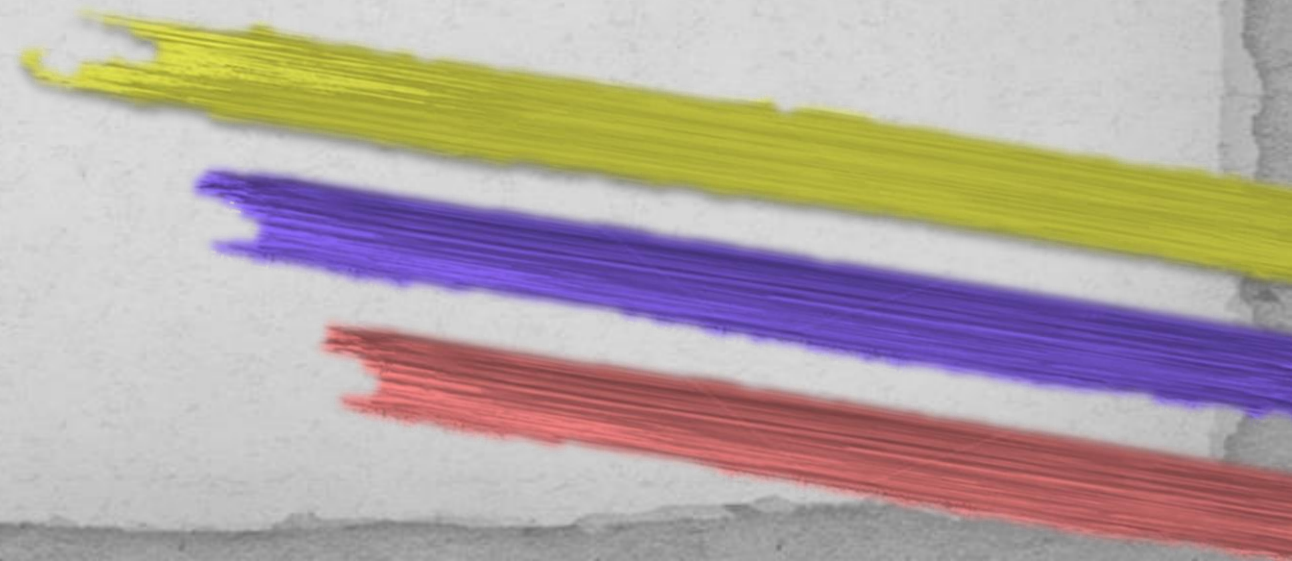
7. TRIMETROPIMA/SULFAMETOXAZOL



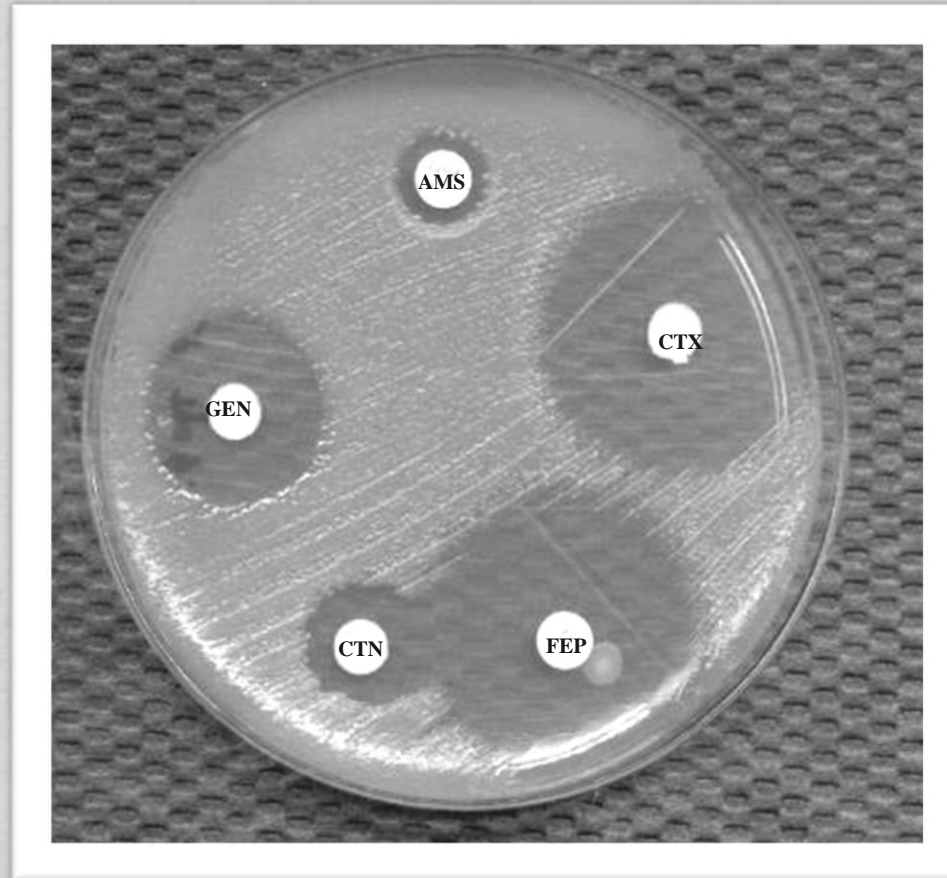
9. DUPLO HALO



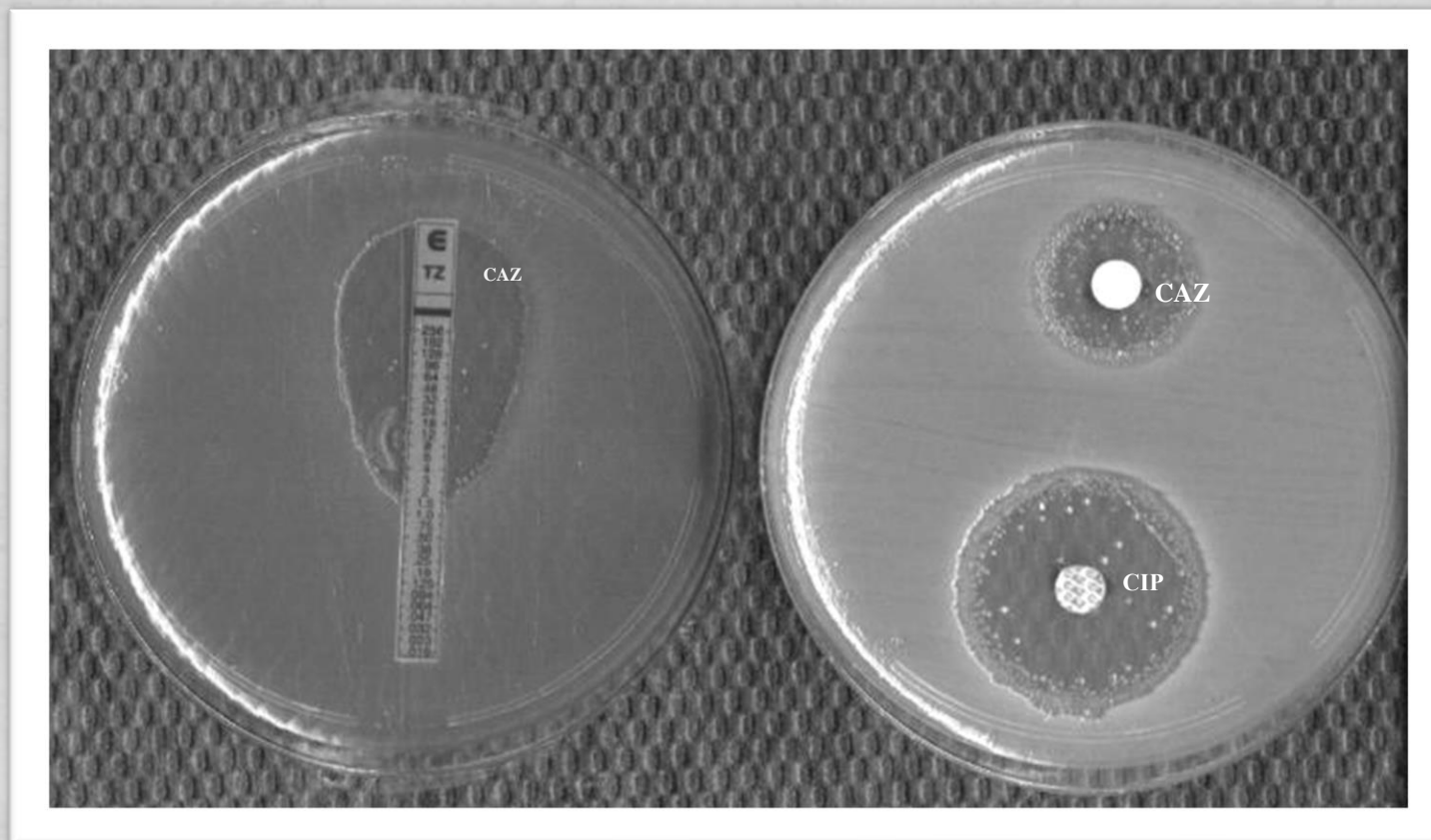
Utilidades



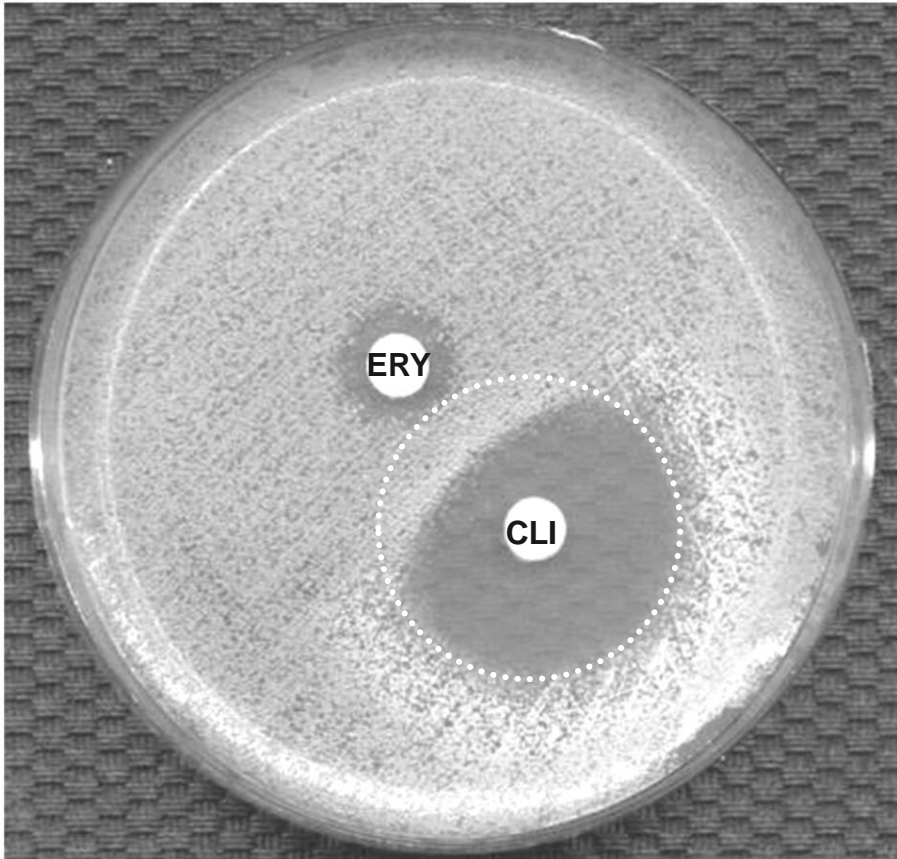
Contaminação do antibiograma
Escherichia coli



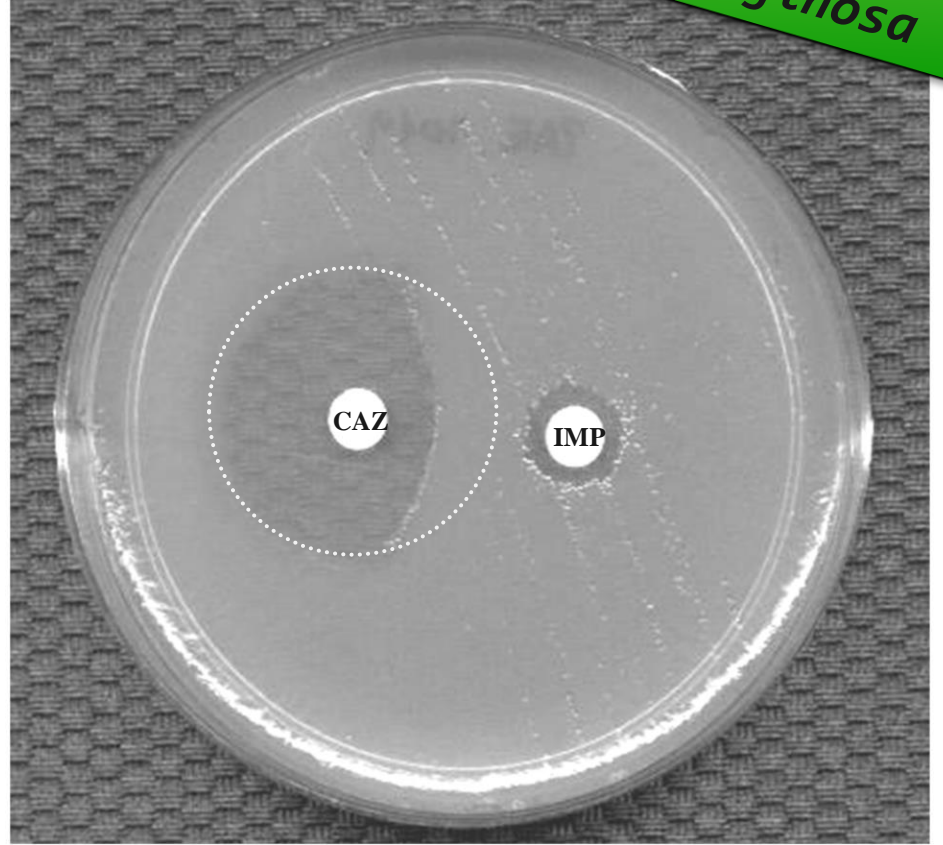
Seleção de subpopulação resistente
Enterobacter cloacae



Mecanismo MLS induzível
Staphylococcus aureus

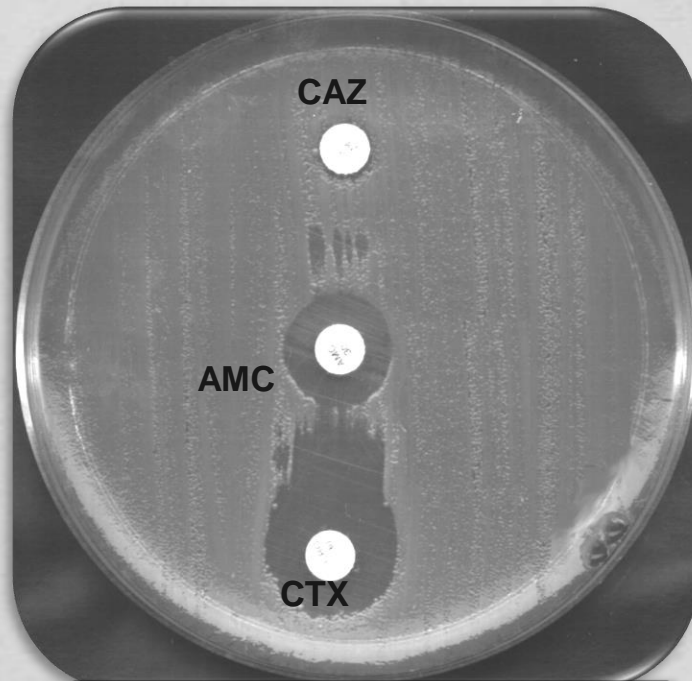
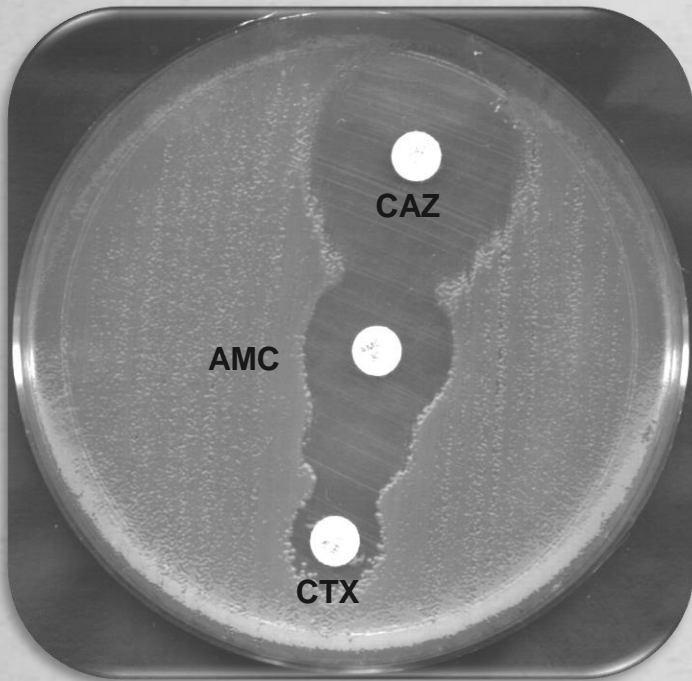


Indução de Cefalosporinase
Cromossômica
Pseudomonas aeruginosa



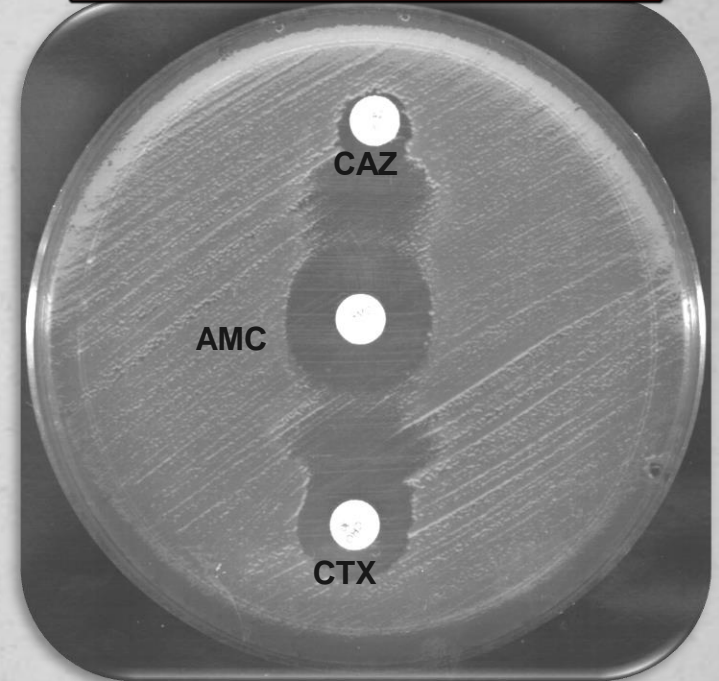
**DETECÇÃO DE β -lactamases de Espectro Estendido
Inibição com ácido clavulânico**

***E. coli* CTX-M-2**



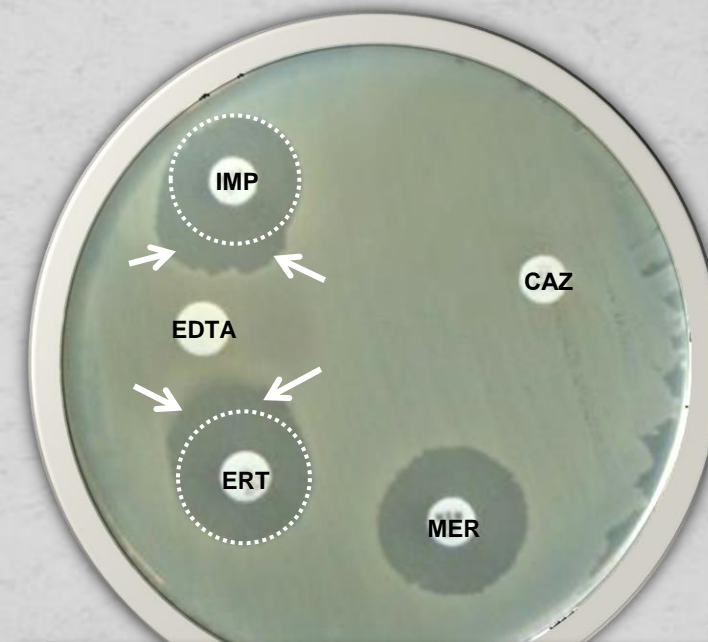
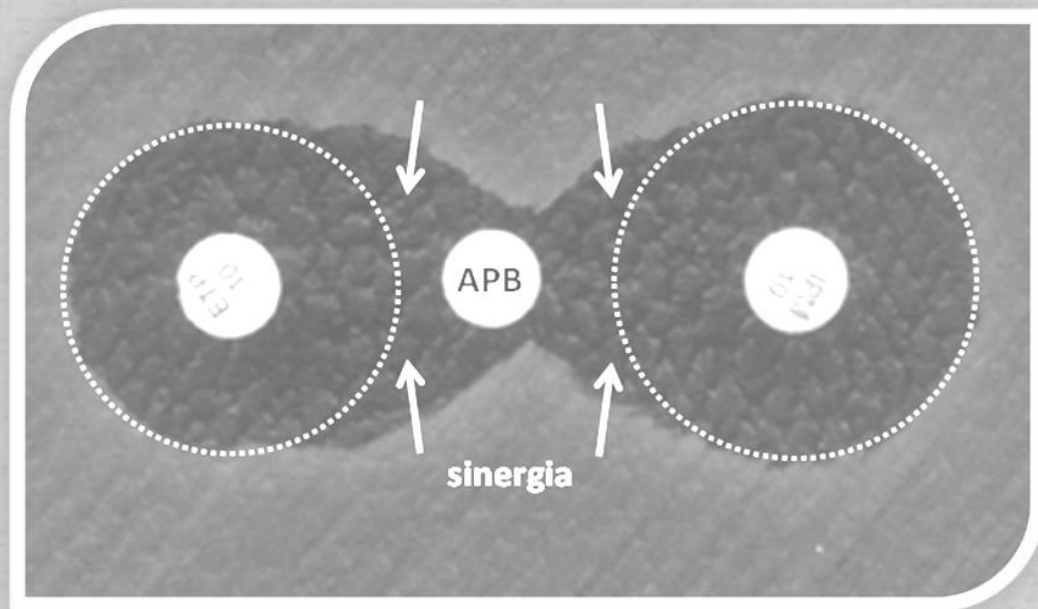
***E. coli* SHV-5**

***E. coli* PER-2**



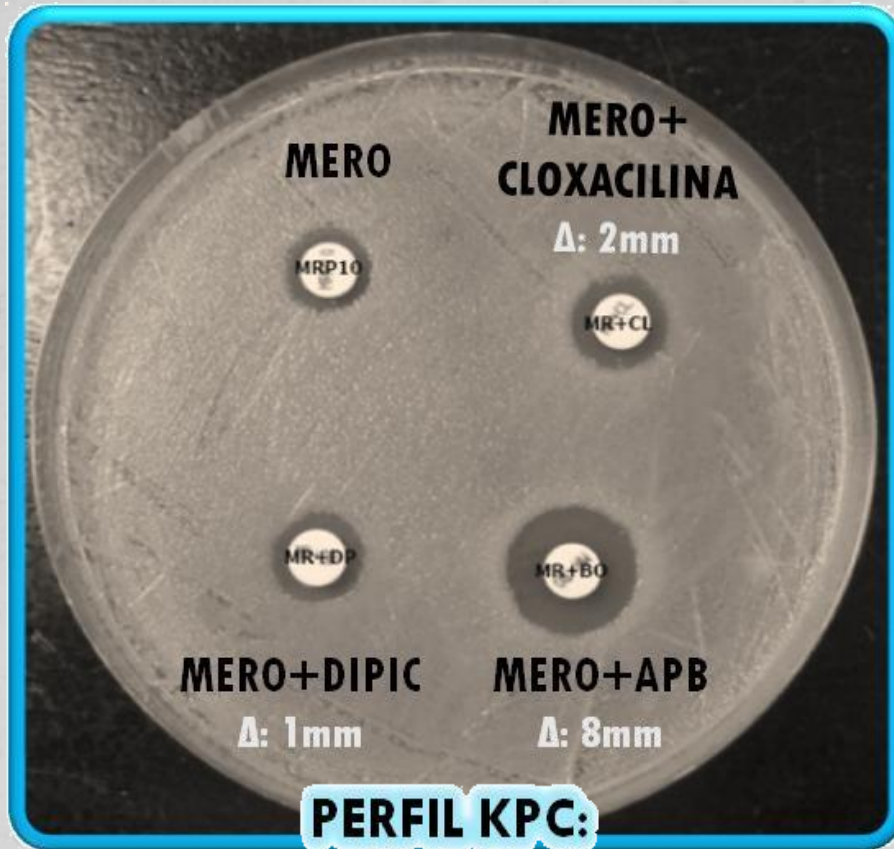
**DETECÇÃO DE CARBAPENEMASES:
Inibição com Ac. Borônico e com EDTA**

***K. pneumoniae* KPC+**

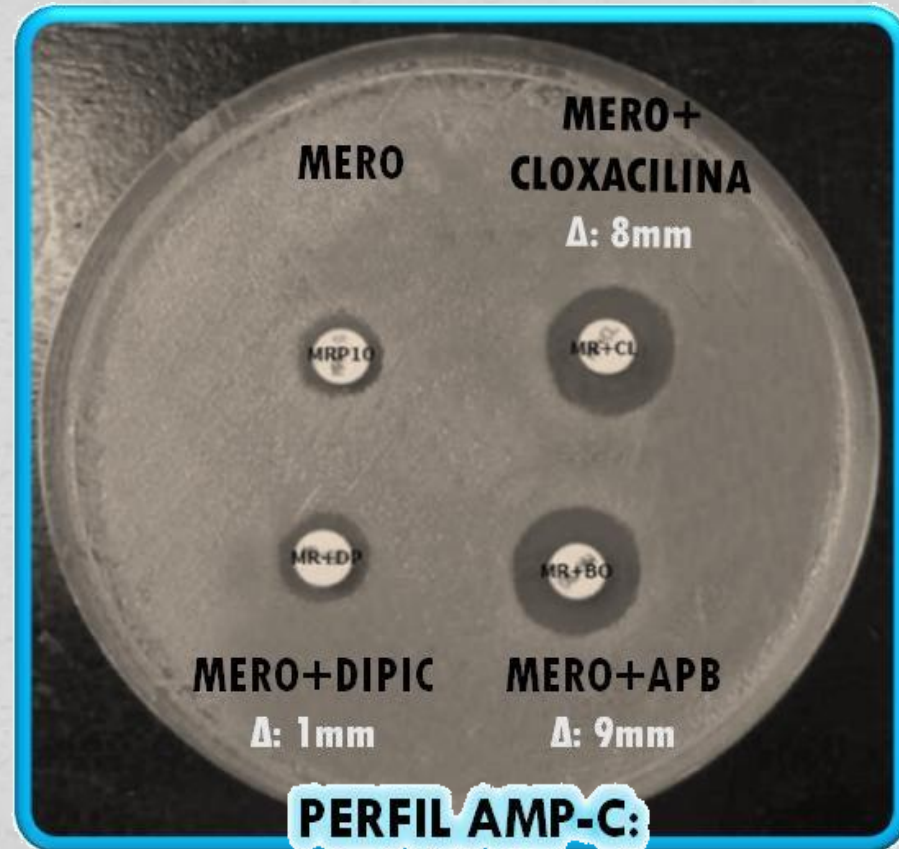


***E. cloacae* MBL IMP-1**

DETECÇÃO DE CARBAPENEMASES: Método de discos combinados



APB $\Delta \geq 4\text{mm}$ (POS)
CLOXACILINA $\Delta < 5\text{mm}$ (NEG)
DIPICOLINICO $\Delta < 5\text{mm}$ (NEG)

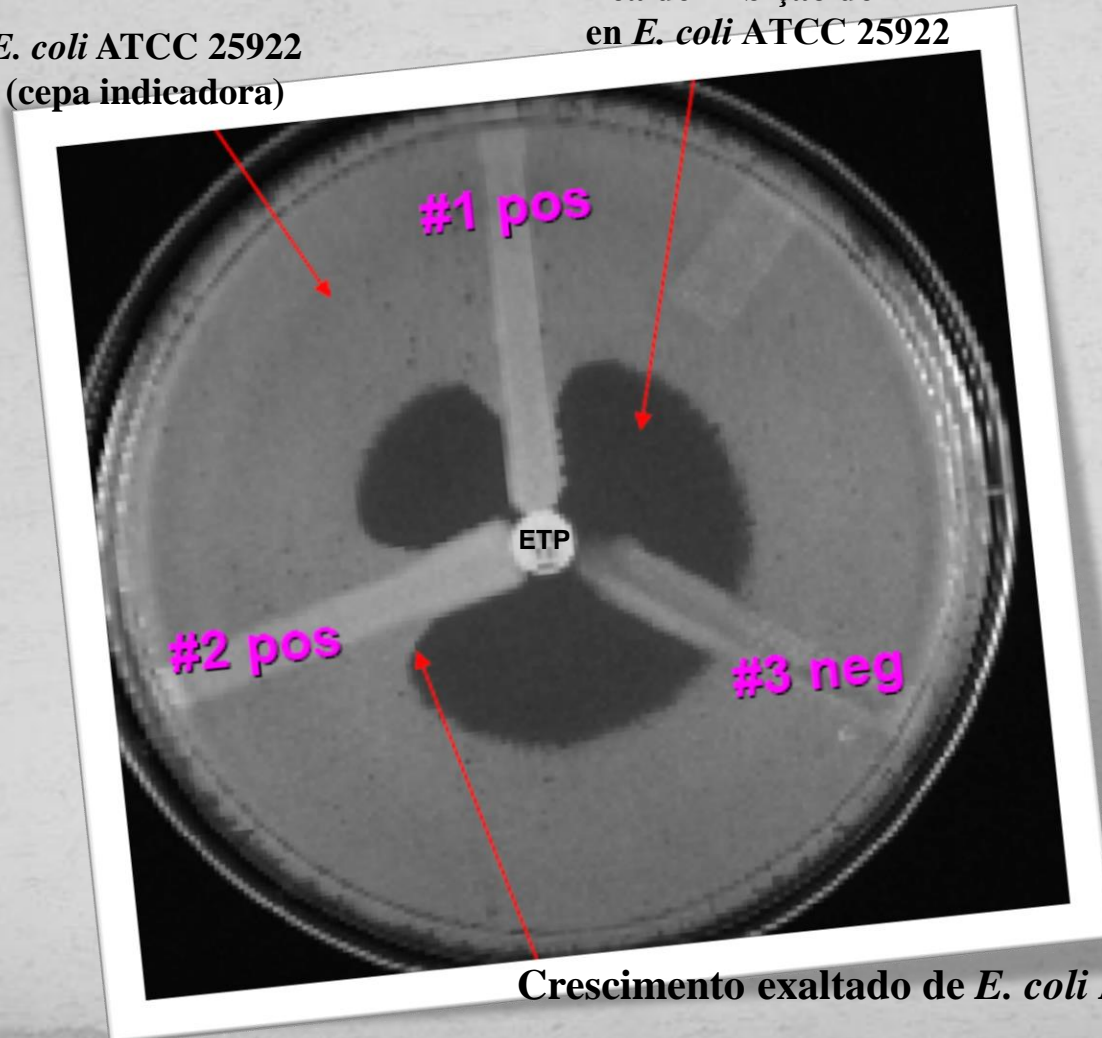


APB $\Delta \geq 4\text{mm}$ (POS)
CLOXACILINA $\Delta \geq 5\text{mm}$ (POS)
DIPICOLINICO $\Delta < 5\text{mm}$ (NEG)

Método Microbiológico de Hodge: Detecção de atividade enzimática

E. coli ATCC 25922
(cepa indicadora)

Área de inibição de ERT
em *E. coli* ATCC 25922



Crescimento exaltado de *E. coli* ATCC 25922

Método Hodge

#1: Cepa clínica, resultado positivo

#2: *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1705,
controle positivo

#3: *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1706,
controle negativo

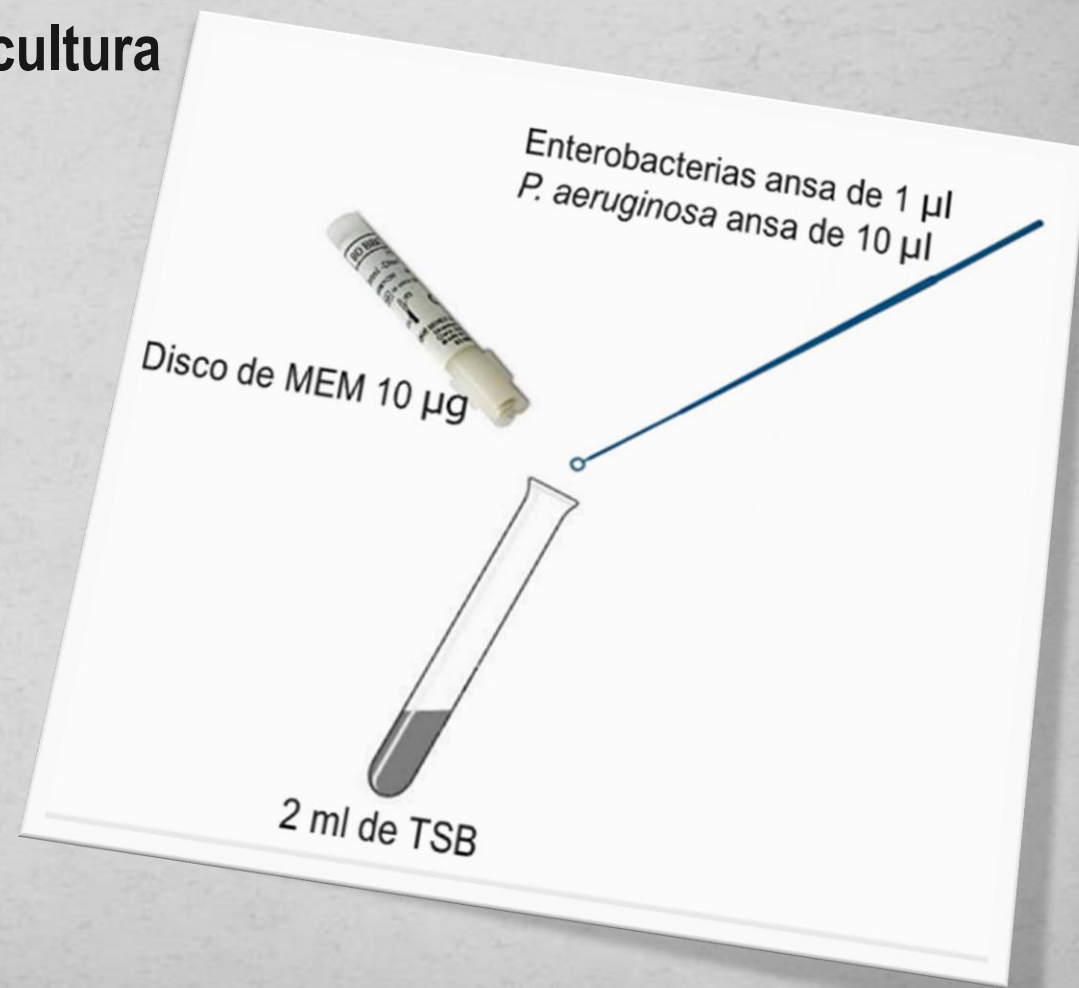
Método de Inativação de Carbapenem modificado (mCIM)
para suspeita de produção de carbapenemase

- mCIM: método para detecção de carbapenemase em Enterobacterales e *P. aeruginosa*.
- eCIM: realiza-se junto com o mCIM para diferenciar metalo- β -lactamase de serin-carbapenemase em Enterobacterales.

mCIM: procedimento

1. Inocular 2ml de caldo TSB com a cepa a estudar: ansa completa de 1 μ l para ETB e de 10 μ l para Pae (cultura overnight em A. sangue).
2. Vortexear.
3. Adicionar um disco de 10 μ g de Meropenem.
4. Incubar a 35°C por 4h.
5. Retirar o disco e coloca-lo em uma placa de MH esfregada com *E. coli* ATCC® 25922.
6. Incubar a 35°C por 18-24h.
7. Ler o halo de inibição e interpretar.

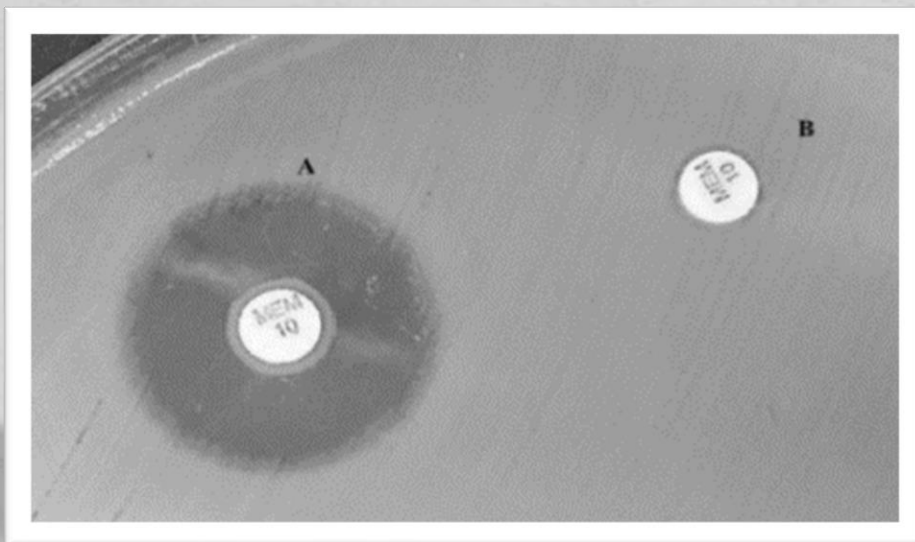
TABELA 3C, M100 32° ed.



mCIM: interpretação

TABELA 3C, M100 32^o ed.

- Carbapenemase positivo: halo entre 6-15mm, ou 16-18mm com colônias intra-halo.
- Carbapenemase negativo: halo ≥ 19 mm
- Indeterminado: halo entre 16-18mm, ou ≥ 19 mm com colônias intra-halo.

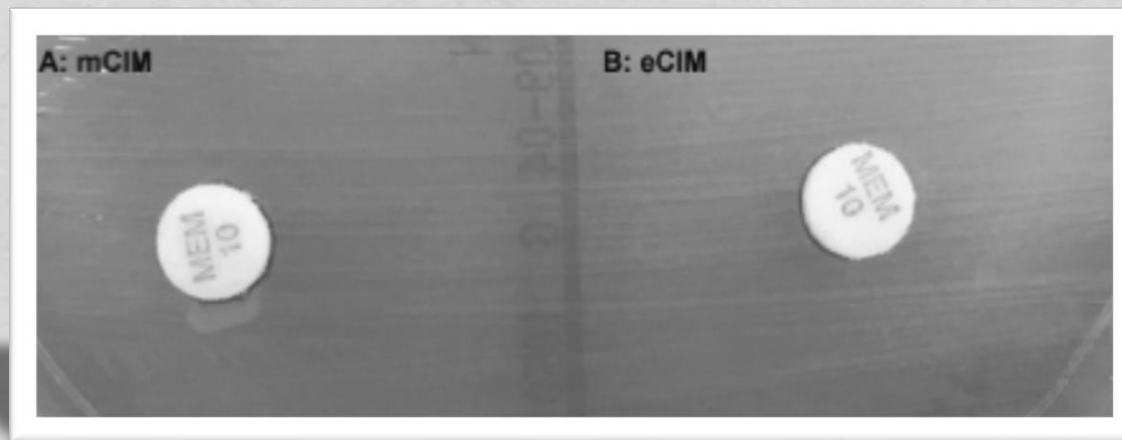


- A) Controle Negativo: *K. pneumoniae* ATCC[®] BAA-1706[™]
- B) Controle Positivo: *K. pneumoniae* ATCC[®] BAA-1705[™]

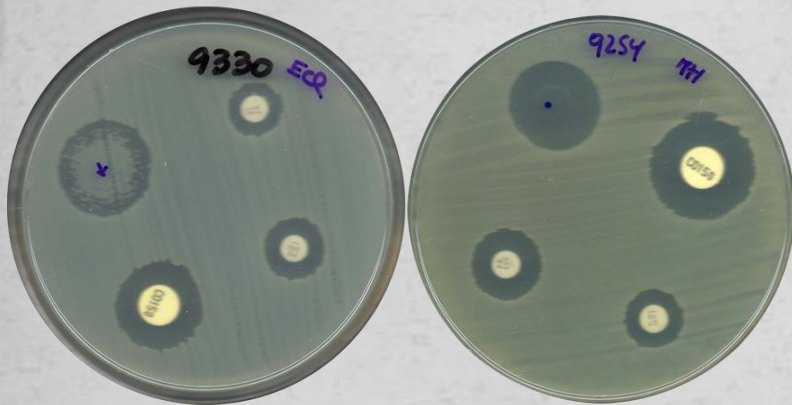
eCIM: interpretação

TABELA 3C, M100 32° ed.

- mCIM negativo → não interpretar eCIM
- mCIM positivo → MBL positivo: incremento de $\geq 5\text{mm}$ do halo de eCIM vs. mCIM
 - Serín-carbapenemase positivo: incremento de $\leq 4\text{mm}$ do halo de eCIM vs. mCIM



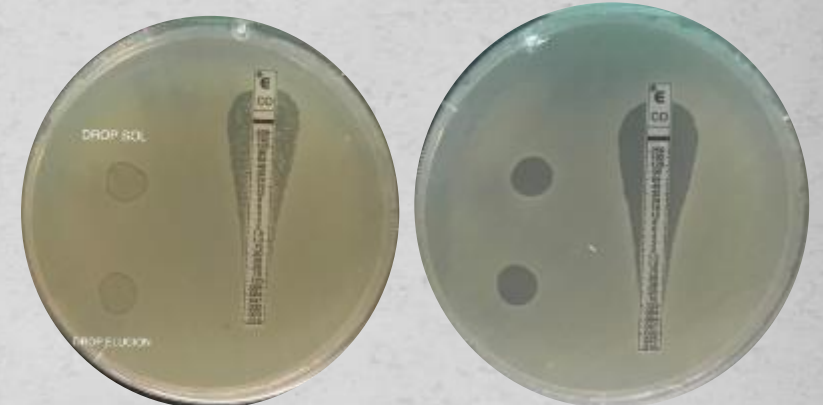
Métodos para a avaliação de sensibilidade a Colistina Enterobacterales, *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.



Predifusão com tabletes



Colistina Ágar Spot



Drop Test

OBRIGADO PELA SUA ATENÇÃO

ealbornoz@anlis.gob.ar

atb@anlis.gob.ar

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



Organización de las Naciones
Unidas para la Alimentación
y la Agricultura



ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro



Unión Europea