

BrCAST

Brazilian Committee on
Antimicrobial Susceptibility Testing

OFICINA BrCAST
28 de setembro de 2019
CURITIBA – PARANÁ

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

Detecção de mecanismos de resistência segundo o BrCAST



Dr^a. Jussara Kasuko Palmeiro

Professora Adjunta

Departamento de Análises Clínicas do Centro de Ciência da Saúde (ACL, CCS)

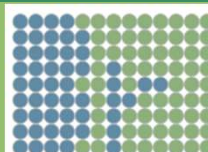
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Diretora do Núcleo de Estudos de Bacteriologia Clínica de Curitiba (NEBaC)

Realização:



Apoio:



BrCAST
Brazilian Committee on
Antimicrobial Susceptibility Testing



Lista de bactérias que necessitam com urgência de novos antibióticos



Acinetobacter baumannii, carbapenem-resistant

Pseudomonas aeruginosa, carbapenem-resistant

*Enterobacteriaceae**, carbapenem-resistant, 3rd generation cephalosporin-resistant

Priority 1: CRITICAL

Enterococcus faecium, vancomycin-resistant

Staphylococcus aureus, methicillin-resistant, vancomycin intermediate and resistant

Helicobacter pylori, clarithromycin-resistant

Campylobacter, fluoroquinolone-resistant

Salmonella spp., fluoroquinolone-resistant

Neisseria gonorrhoeae, 3rd generation cephalosporin-resistant, fluoroquinolone-resistant

Priority 2: HIGH

Streptococcus pneumoniae, penicillin-non-susceptible

Haemophilus influenzae, ampicillin-resistant

Shigella spp., fluoroquinolone-resistant

Priority 3: MEDIUM

Infectious Diseases Society of America. IDSA Public Police. CID, 2010; 50:1081–1083

World Health Organization - <https://www.who.int/emergencies/ten-threats-to-global-health-in-2019>

<https://www.who.int/news-room/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>



Orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência aos antimicrobianos

Versão 1.0 Dez 2013/ Jan 2015

1. *Enterobacteriaceae** produtoras de carbapenemase
2. *Enterobacteriaceae** produtoras de ESBL
3. *Enterobacteriaceae** produtoras de AmpC adquiridas
4. *S. aureus* resistente à meticilina (oxacilina)
5. *S. aureus* não sensíveis aos glicopeptídeos
6. *E. faecium* e *E. faecalis* resistentes à vancomicina
7. *S. pneumoniae* não sensíveis à penicilina

Versão 2.0 Jul 2017/ Set 2018

1. *Enterobacteriaceae** produtoras de carbapenemase
2. *Enterobacteriaceae** produtoras de ESBL
3. *Enterobacteriaceae** produtoras de AmpC adquiridas
4. Bacilos Gram negativos resistentes a polimixina
5. *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* resistentes aos carbapenêmicos
6. *S. aureus* resistente à meticilina (oxacilina)
7. *S. aureus* não sensíveis aos glicopeptídeos
8. *E. faecium* e *E. faecalis* resistentes à vancomicina
9. *S. pneumoniae* não sensíveis à penicilina



BrCAST

Brazilian Committee on
Antimicrobial Susceptibility Testing



<http://brcast.org.br>



Documentos

NOVO

1 - Tabela-pontos-de-corte-clínicos-BrCAST-06-02-2019

Tabela-pontos-de-corte-clínicos-BrCAST-06-02-2019 (1).pdf

1.8 MB
8229 Downloads

[DETAILS](#)



NOVO

2 - Tabela-pontos-de-corte-clínicos-BrCAST-06-02-2019-P

Tabela-pontos-de-corte-clínicos-BrCAST-06-02-2019-P.xlsx

4.7 MB
1517 Downloads

[DETAILS](#)



3 - Redefinição Das Categorias Dos Testes De Sensibil S, I E R

Redefinição das Categorias dos Testes de Sensibil S, I e R.pdf

1.4 MB
3424 Downloads

[DETAILS](#)



4 - Orientações Do EUCAST Para A Detecção De Mecanismos De Resistência E Resistências Específicas

Orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas(2).pdf

1.4 MB
3540 Downloads

[DETAILS](#)



5 - Tabelas-Controlde-de-Qualidade-Rotina-e-Estendido-BrCAST 23 09 18

Tabelas-Controlde-de-Qualidade-Rotina-e-Estendido-BrCAST 23_09_18.pdf

411.8 KB
2076 Downloads

[DETAILS](#)





Orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência aos antimicrobianos

O que você encontra no documento

- ✓ Definição dos mecanismos de resistência
- ✓ Informações sobre a necessidade clínica e de saúde pública para detecção dos mecanismos de resistência
- ✓ Descrição resumida dos métodos recomendados para detecção dos mecanismos de resistência

O que você não encontra no documento

- Procedimentos técnicos para identificação molecular dos mecanismos de resistência
- Procedimento de triagem de pacientes colonizados por MO-MDR
- Procedimento de detecção de MO-MDR diretamente de amostras clínicas

1

Enterobacteriaceae* produtores de carbapenemases

Detecção do mecanismo de
resistência **não** é necessária para
categorização clínica de
sensibilidade

Enterobacteriaceae* leia-se ordem ***Enterobacterales***

Quando suspeitar??



Quando suspeitar??

Pontos de corte clínicos e para triagem de *Enterobacterales* produtores de carbapenemase segundo BrCAST

Carbapenêmico	CIM (ug/mL)		Diâmetro do halo de inibição (mm)	
	Ponto de corte (S/I)	Ponto de corte para triagem	Ponto de corte (S/I)	Ponto de corte para triagem
Meropenem*	≤ 2	$> 0,12$	≥ 22	$< 28^{***}$
Ertapenem**	$\leq 0,5$	$> 0,12$	≥ 25	< 25

* Melhor sensibilidade e especificidade

** Elevada sensibilidade, mas baixa especificidade

*** Isolados com 25-27 mm investigar carbapenemase se R a PTZ e/ou temocilina.

Sempre investigar carbapenemase se MER < 25 mm

CLSI MER/IMI ≥ 2 ug/mL, ERT ≥ 1 ug/mL. MER/IMI ≤ 22 mm, ERT ≤ 21 mm

Orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas

Suspeitou?? Faça testes fenotípicos



1 Teste do disco combinado

2 Testes bioquímicos (colorimétricos)

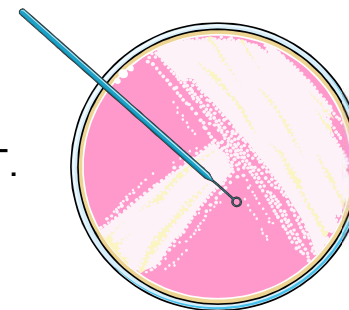
3 Teste de inativação de carbapenêmico

4 Teste de hidrólise de carbapenêmico por MALDI-TOF

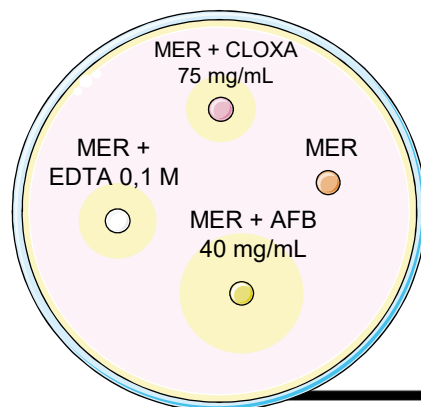
5 Teste imunocromatográfico de fluxo lateral

Teste do disco combinado

Versão comercial discos ROSCO e MAST.



FALSO POSITIVO



Diâmetro do halo do **meropenem** < 28 mm no disco-difusão (ou CIM > 0,12 mg/L) em todas as *Enterobacteriaceae* *

Exceção:
Meropenem 25-27 mm E
piperacilina/tazobactam = I/S:
Nenhum teste é necessário

Sinergismo apenas
com ác. borônico

KPC (ou outra
carbapenemase da
classe A)

Sinergismo com
ác. borônico e
cloxacilina

AmpC
(cromossômica ou
plasmidial) mais
perda de porina

Sinergismo apenas
com ác.
dipicolínico / **EDTA**

Metalo-β-
lactamase (MBL)

Sem sinergismo¹

R² a temocilina:
OXA-48

S a temocilina:
ESBL mais perda
de porina

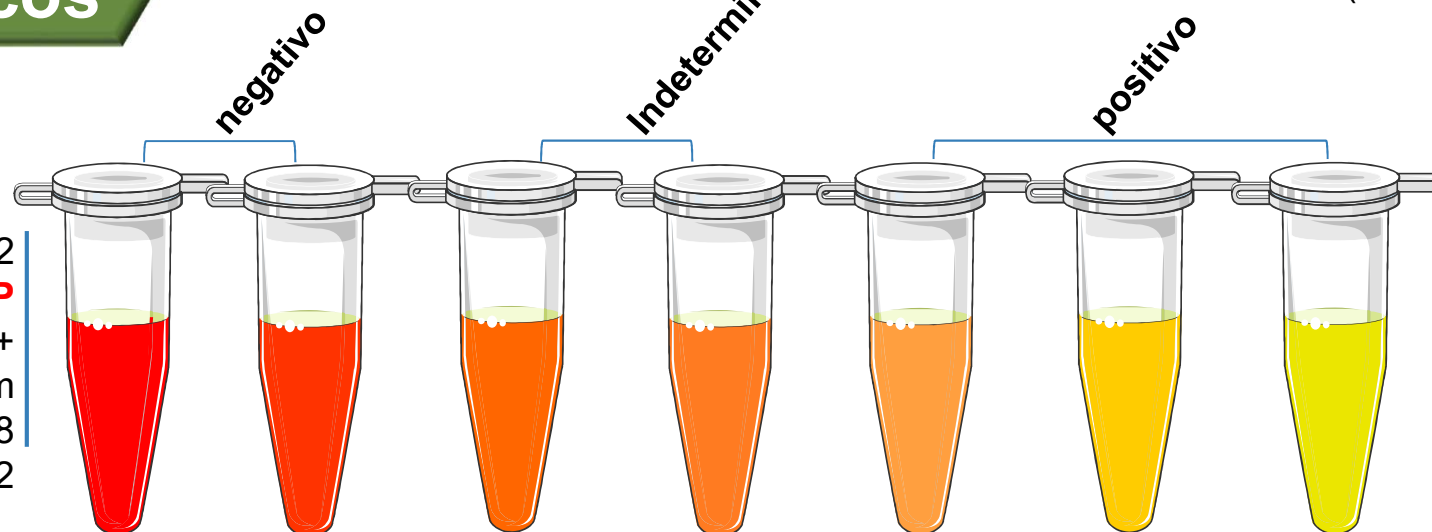
¹ Combinação de várias carbapenemases pode não mostrar o sinergismo – ou seja, MBL e KPC em combinação. Testes moleculares são necessários nestes casos.

² Alto nível de resistência à temocilina (CIM > 128 mg / L, diâmetro do halo < 11 mm) é indicador fenotípico de produção de OXA-48.

Testes colorimétricos

Versão comercial RAPIDEC® CARBA NP (Biomérieux),
β CARBA TEST (Bio-Rad),
Azul Carba (DME)

2012
CARBA NP
Vermelho de fenol +
imipenem
pH 7.8
Nordmann P et al., 2012



2013
BLUE CARBA
Azul de bromotimol +
imipenem
pH 6.8
Pires J et al., 2013



- Aliquotar 10 mg de Tienam
- Reconstituir com 1 mL do tampão
- Aliquotar 100 uL para os testes

*Hiperprodução
de K1 em KOX*



FALSO POSITIVO

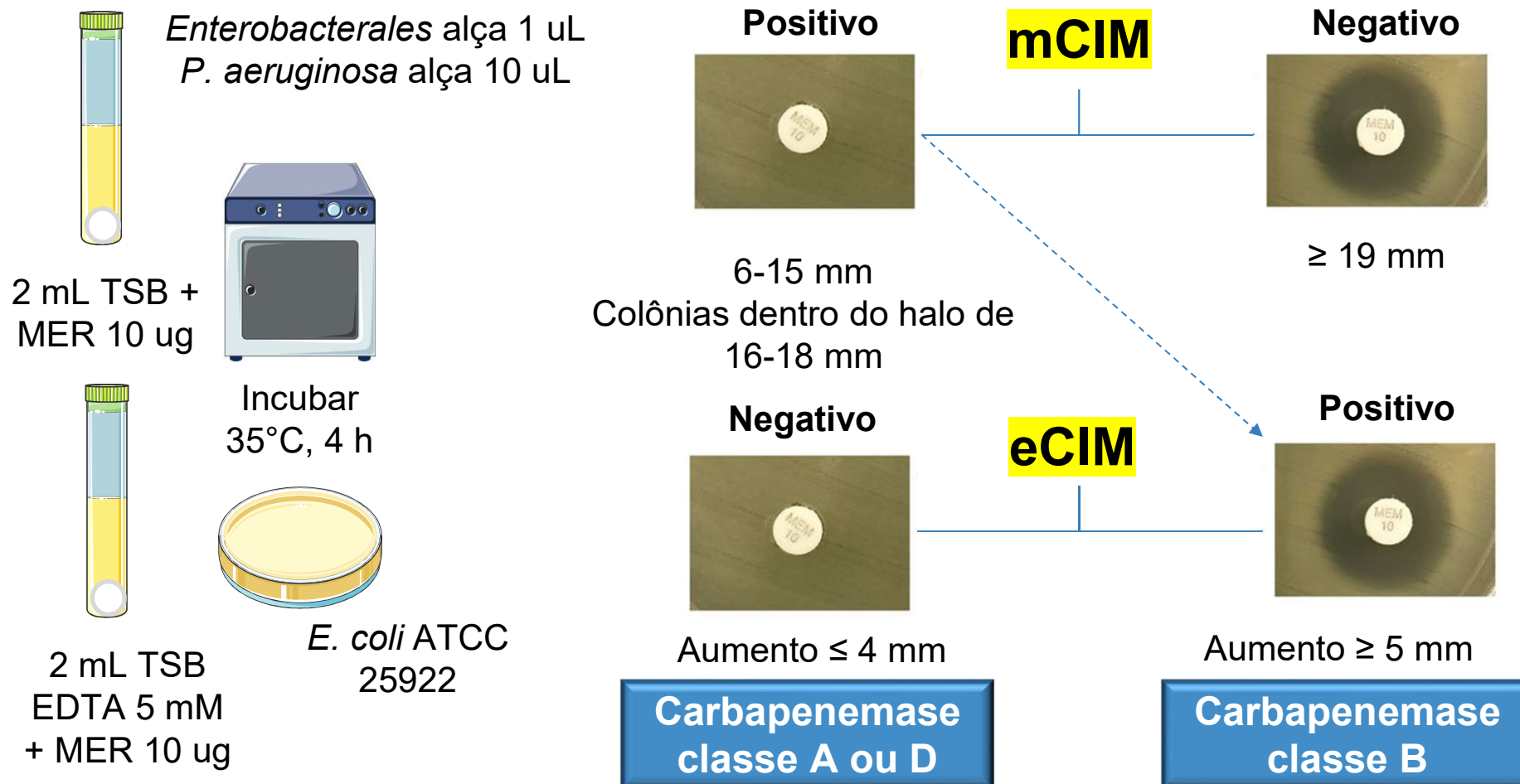
Orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas.

Teste de inativação mCIM eCIM

Modified Carbapenem Inactivation Method (mCIM) & EDTA-mCIM (eCIM).

mCIM é padronizado para *Enterobacterales* e *P. aeruginosa*

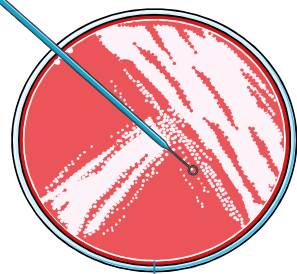
eCIM somente para *Enterobacterales*



Teste de hidrólise

Versão comercial MBT STAR-Carba IVD (Bruker).

Adicionar 500 uL solução de ertapenem 0.5 mg/mL em tampão (20 mM Tris-HCl, pH 6.8) e vortex



Incubar 36°C, 2-4 h

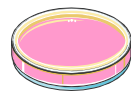


Centrifugar 13.000 rpm, 1 min, TA

Transferir 1 uL do sobrenadante



Adicionar 1 uL matriz HCCA

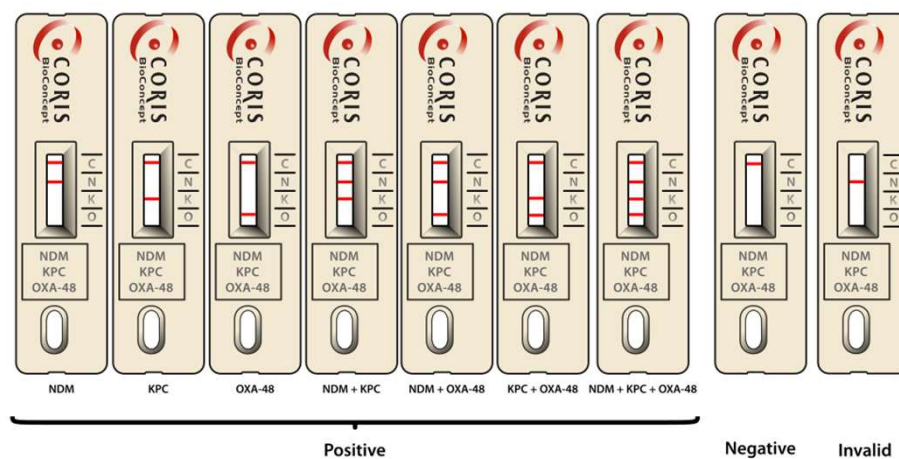
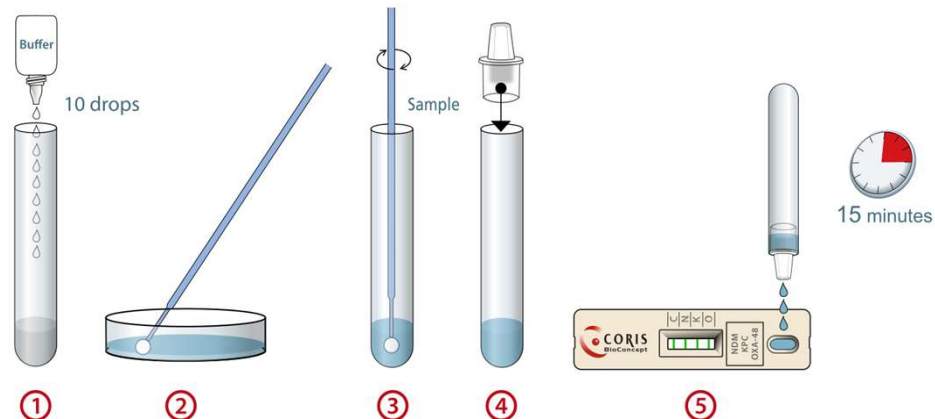


Falso negativo



Teste imunocromatográfico

Versão comercial RESIST-3 O.K.N. K-Set (Coris Bioconcept).
NG-Test CARBA 5 (NG Biotech).



Orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas.
Carvalhoes CG et al., 2013. Ramos AC et al., 2016. Leonard DA et al., 2008.

2

*Enterobacteriaceae** produtoras β -lactamases de espectro estendido

Detecção do mecanismo de
resistência **não** é necessária para
categorização clínica de
sensibilidade

*Enterobacteriaceae** leia-se ordem *Enterobacterales*

O que muda na triagem que eu já faço?



Pontos de corte para triagem de *Enterobacterales* produtores de ESBL

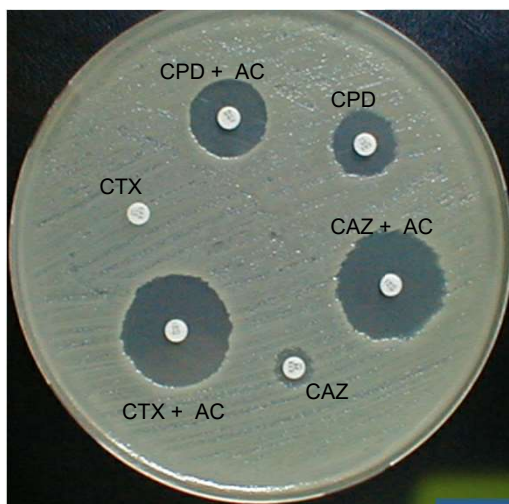
	Método	Antibiótico	Suspeita de ESBL se
BrCAST	Diluição em caldo	CTX ou CRO e CAZ	CIM > 1 ug/mL
		CPD	CIM > 1 ug/mL
	Disco-difusão	CTX (5 ug) ou CRO (30 ug) CAZ (10 ug)	< 21 mm < 23 mm < 22 mm
		CPD (10 ug)	< 21 mm
CLSI	Diluição em caldo	CTX ou CRO e CAZ	CIM > 1 ug/mL
		CPD	CIM > 4 ug/mL
	Disco-difusão	CTX (30 ug) ou CRO (30 ug) CAZ (30 ug)	≤ 27 mm ≤ 25 mm ≤ 22 mm
		CPD (10 ug)	≤ 17 mm

CTX: cefotaxima, CRO: ceftriaxona, CAZ: ceftazidima, CPD: cefpodoxima.

Tabela-pontos-de-corte-clinicos-BrCAST-06-02-2019. CLSI M100-S29, 2019.

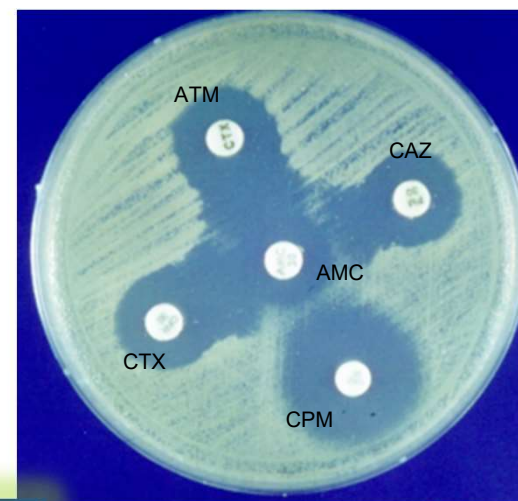
TDC

Teste do disco combinado



TSDD

Teste do sinergismo do duplo disco



Distância ótima 20 mm **

Testes fenotípicos

Não tem finalidade confirmatória e nem para CIM

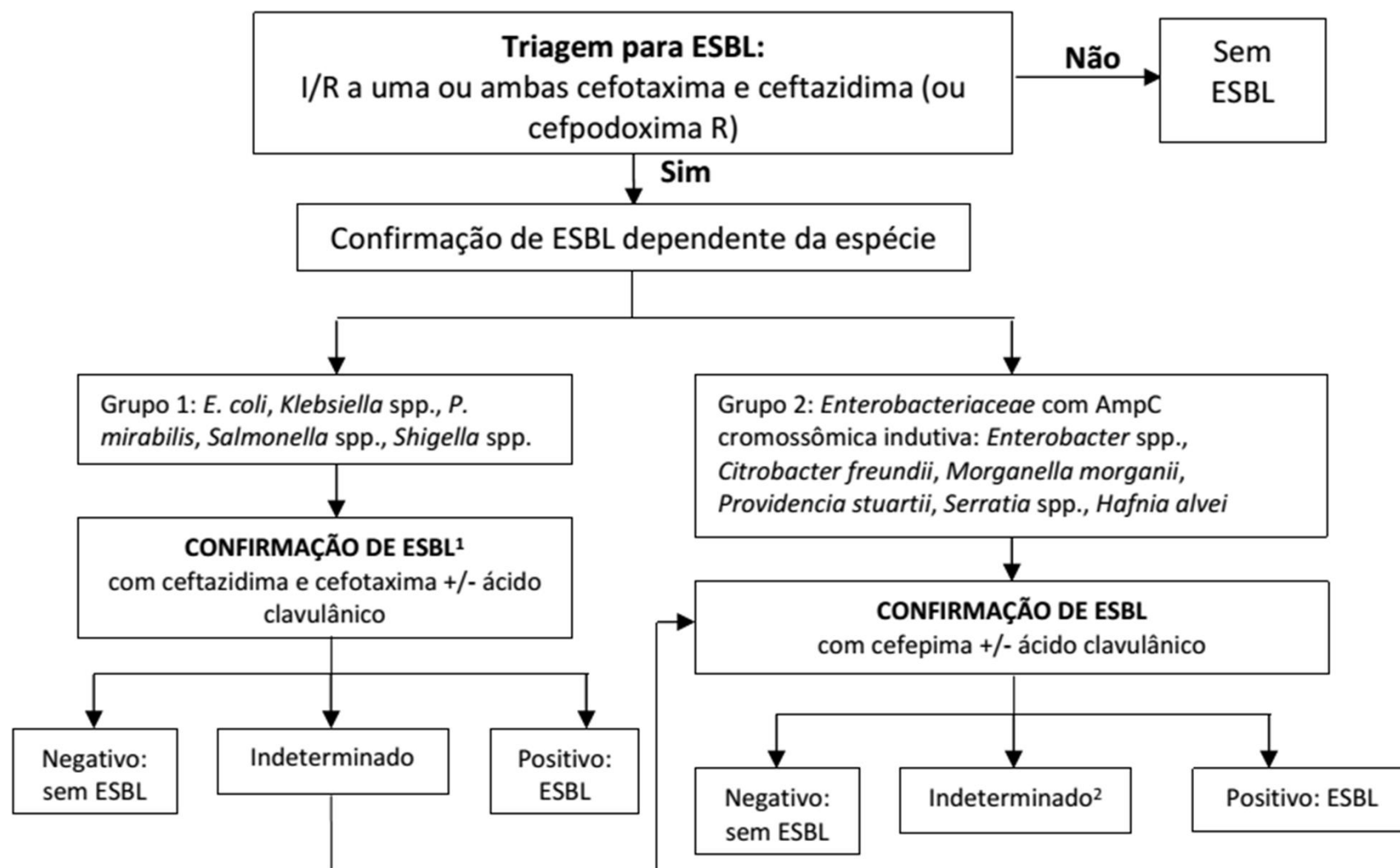


FITA DE GRADIENTE

AUTOMAÇÃO

Falso Positivo

- Hiperprodução de K1 em *K. oxytoca* e outras β -lactamases cromossômicas em *P. vulgaris*, *P. penneri*, *C. koseri*, *C. sedlakii*, *C. amalonaticus*, *C. farmeri*
- Hiperprodução de SHV-1, TEM-1 ou OXA-1 + alteração de porinas



¹Caso a cefoxitina tenha sido testada e a CIM seja >8 mg/L, realizar teste confirmatório com cefepima +/- ácido clavulânico.

²Não pode ser determinado como positivo ou negativo (i.e., a fita não pode ser lida devido ao crescimento além da faixa de CIM da fita ou nenhum sinergismo evidente com o disco combinado e com o teste de sinergismo do duplo disco). Caso a confirmação com cefepima +/- ácido clavulânico seja indeterminada há necessidade de teste genotípico.

3

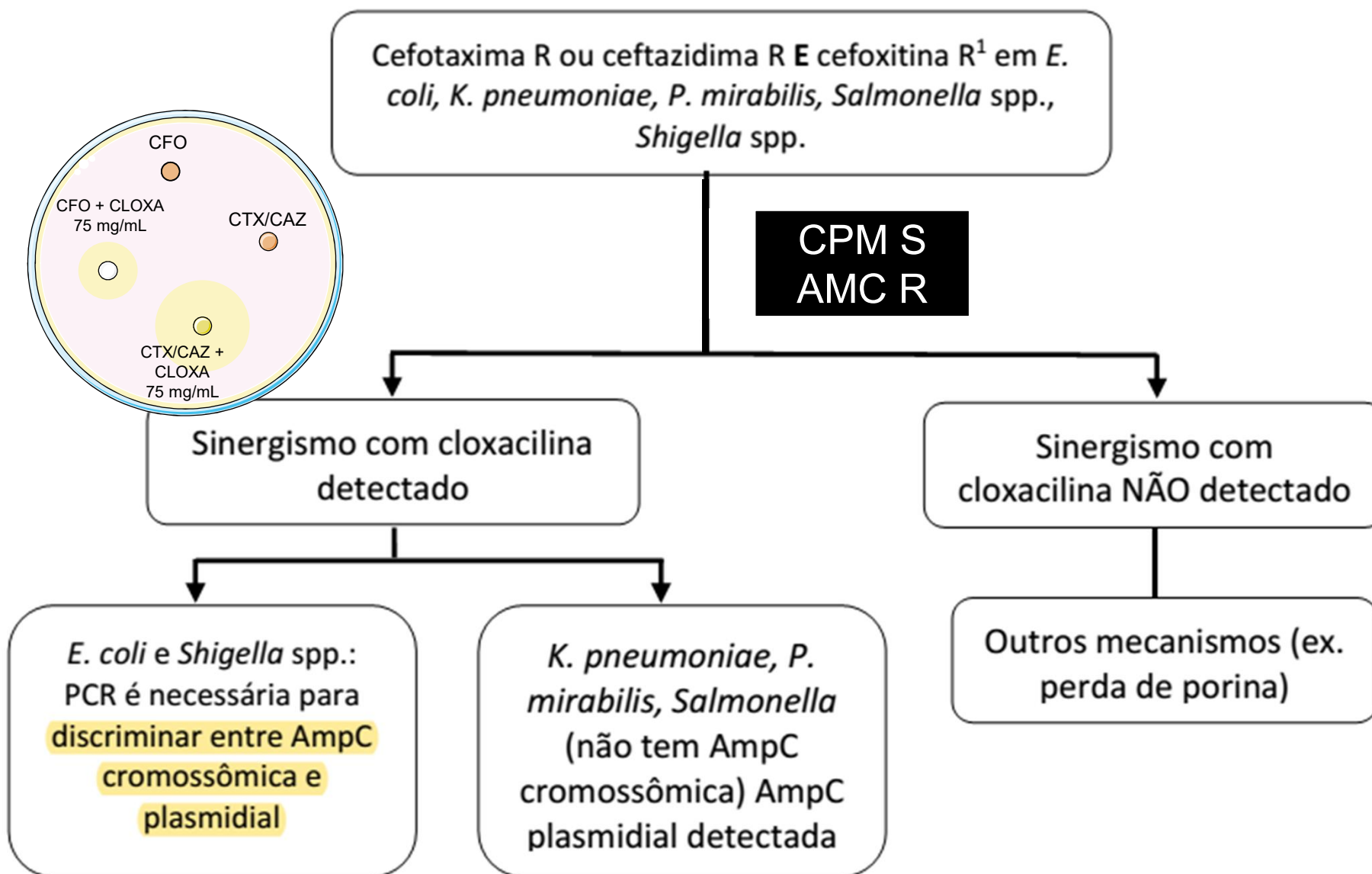
*Enterobacteriaceae** produtoras de β -lactamases AmpC adquiridas

Detecção do mecanismo de
resistência **não** é necessária para
categorização clínica de
sensibilidade

*Enterobacteriaceae** leia-se ordem *Enterobacterales*

Quando suspeitar??





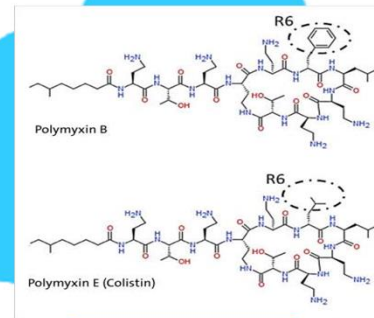
4

Bacilos Gram negativos resistentes às polimixinas

Detecção do mecanismo de resistência **é** necessária para categorização clínica de **sensibilidade**

Não temos ponto de corte clínico. O ponto de corte recomendado pelo BrCAST é baseado no ECOFF (cut-off epidemiológico).

O que o BrCAST recomenda?

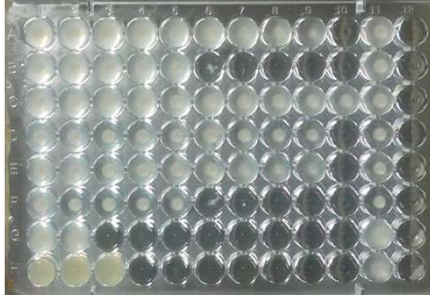


TARJA PRETA

*Não recomenda:
Falso sensível*



- Disco-difusão
- Fita de gradiente
- Diluição em ágar



Microdiluição em caldo é o método referência

Controlar o meio:

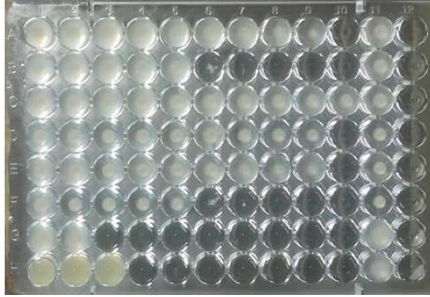
- Ajuste de pH
- Ajuste de cátions (Ca^{+2} e Mg^{+2})

Controlar o material da placa e tubos:

- Poliestireno

Controlar o sal do antimicrobiano:

- Sulfato de polimixina
- Sulfato de colistina



Microdiluição em caldo é o método referência

ICS › 11 › 11.100 › 11.100.20

ISO 20776-1:2019

Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices — Part 1: Broth micro-dilution reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases

Versões comerciais de CIM em caldo



POLICIMBAC™

A	O	O	O	O	O	●	●	●	●	●	O
	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	CC
B	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	CC

Dalmolin TV, 2018. Tese de doutorado

86.6% CA
12.5% ME
1% VME
N = 112



ThermoFisher
SCIENTIFIC

TREK SENSITRE™

GN2F/ GN3F



Matuschek E et al., 2017
Pfennigwerth N et al., 2019

96% EA
95% CA
5% ME
N = 75

81.7% EA
92.9% CA
5% ME
2% VME
N = 325

SensiTest™ Colistin

Liofilchem®

MICRONAUT-S/-AM

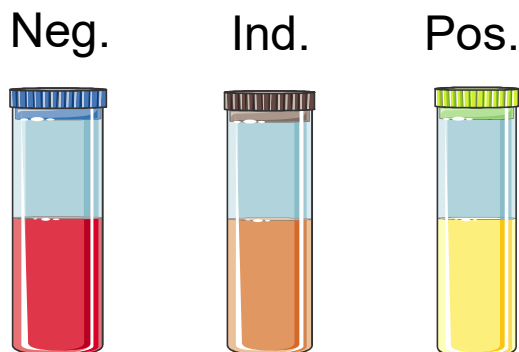
Merlin Diagnostika - Bruker



Versões *in house* para detecção de resistência às polimixinas

Rapid polymyxin NP Test

Nordmann et al., 2016

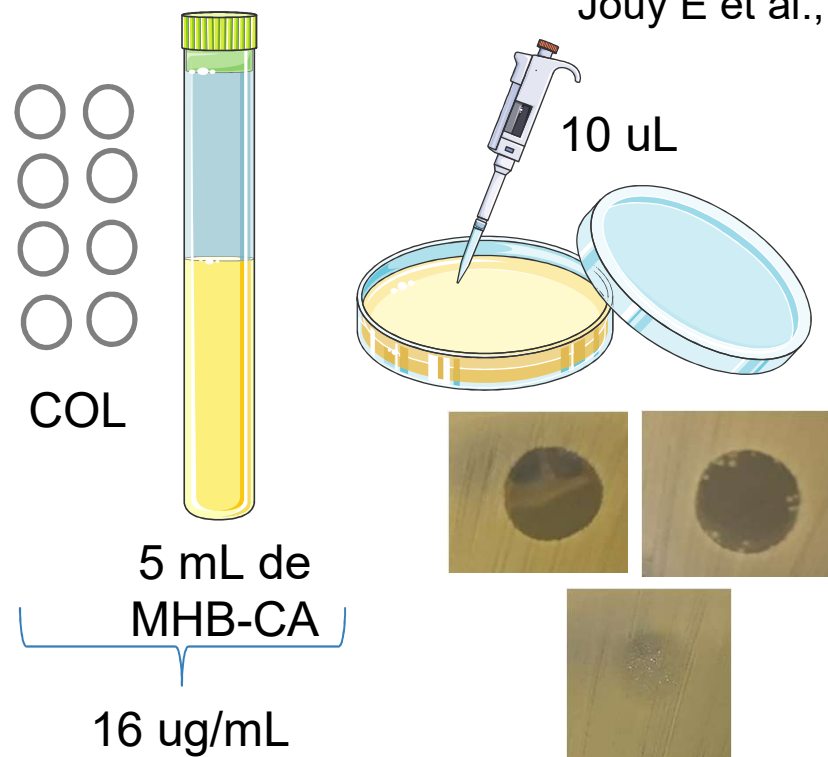


Polimixina 200 ug/mL +
tampão 1:40
2,5% MHB-CA
0,005% Vermelho de fenol
1% D-glucose
pH 7.8
[] final de POL 5 ug/mL

Colistin Drop Test

Pasteran F et al., 2018. 28th ECCMID

Jouy E et al., 2017



Eluir por 30 min e
remove os discos


Válido por 12
meses 2 a 8°C

5

***Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos**

Detecção do mecanismo de resistência **não** é necessária para categorização clínica de sensibilidade

Quais são as recomendações?

MO	Carbapenêmico	BrCAST				CLSI			
		CIM ug/mL		Halo (mm)		CIM (ug/mL)		Halo (mm)	
		S	R	S	R	S	R	S	R
<i>P. aeruginosa</i> 	IMI	≤ 4	> 4	≥ 20	< 20	≤ 2	≥ 8	≥ 19	≤ 15
	MER	≤ 2	> 8	≥ 24	< 18	≤ 2	≥ 8	≥ 19	≤ 15
<i>Acinetobacter</i> spp.	IMI	≤ 2	> 4	≥ 24	< 21	≤ 2	≥ 8	≥ 22	≤ 18
	MER	≤ 2	> 8	≥ 21	< 15	≤ 2	≥ 8	≥ 18	≤ 14

Métodos fenotípicos servem como triagem e devem ser confirmados com testes genotípicos

6

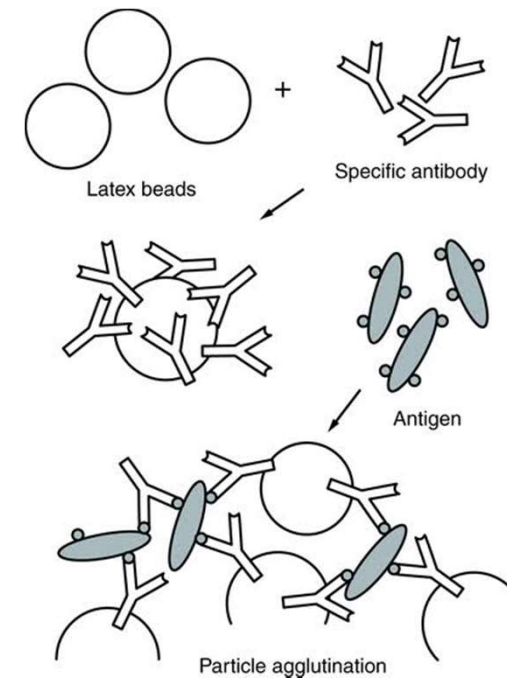
***Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (oxacilina)**

Detecção do mecanismo de resistência **é** necessária para categorização clínica de sensibilidade

O que muda na triagem que eu já faço?

nada

CFO < 22 mm



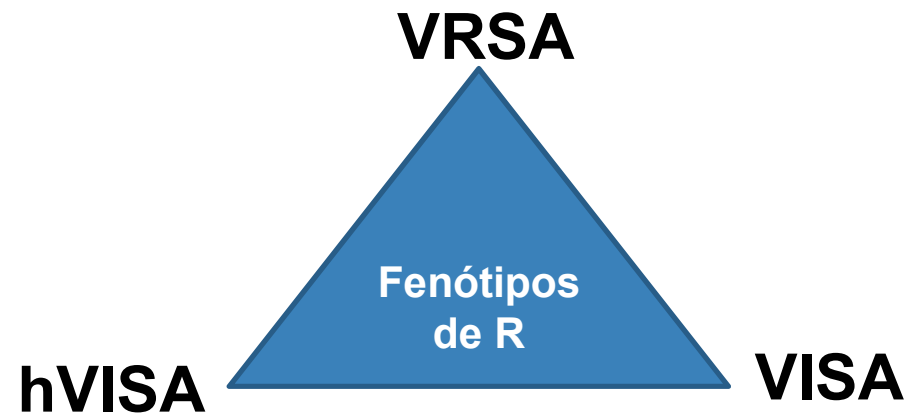
**Aglutinação com látex – pesquisa
de PBP2a**

**Oxoid®
Alere®**

7

***Staphylococcus aureus* não sensíveis aos glicopeptídeos**

Detecção do mecanismo de resistência **é** necessária para categorização clínica de sensibilidade



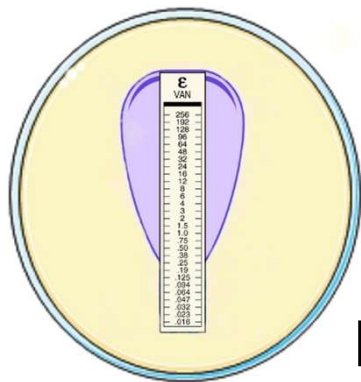
BrCAST x CLSI

- Não tem ponto de corte para intermediário
- Ponto de corte de resistência > 2 ug/mL



Microdiluição em caldo é o método referência

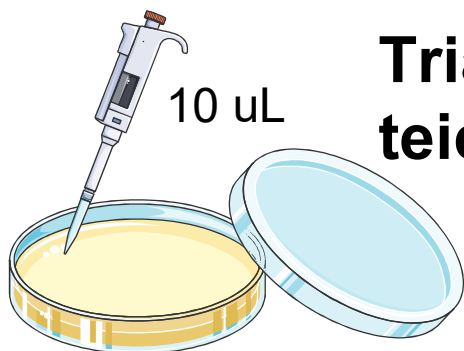
Versão comercial painel de vancomicina – Probac do Brasil.



Fita de gradiente

0,5 a 1 diluição a mais que microdiluição em caldo

Macro gradiente para teicoplanina (≥ 12 ug/mL) e vancomicina (≥ 8 ug/mL)*



Triagem em ágar com teicoplanina 5 mg/mL*

*Ágar BHI
Escala 2 McFarland
48 h incubação

8

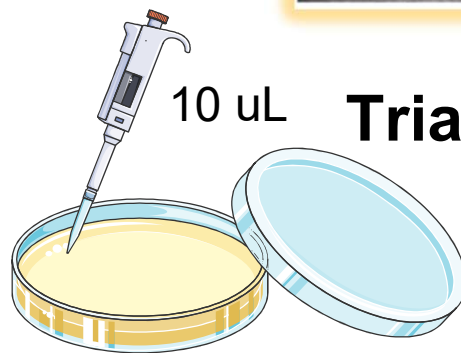
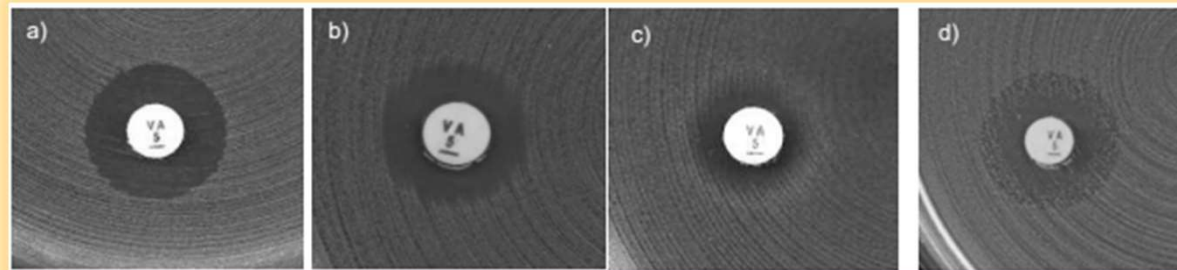
***Enterococcus faecium e Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina**

Detecção do mecanismo de
resistência **é** necessária para
categorização clínica de
sensibilidade

O que muda?

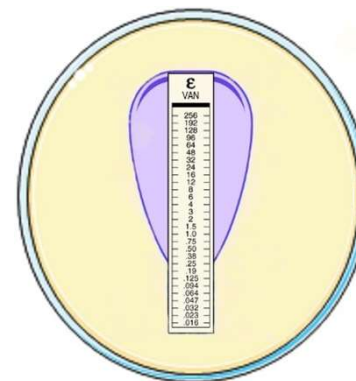
24 h de incubação

BrCAST		CLSI	
VAN 5 ug		VAN 30 ug	
S	R	S	R
≥ 12	< 12	≥ 17	≤ 14



10 uL **Triagem em ágar**

Escala 0,5 McFarland
BHI 6 ug/mL de vancomicina



Macrométodo

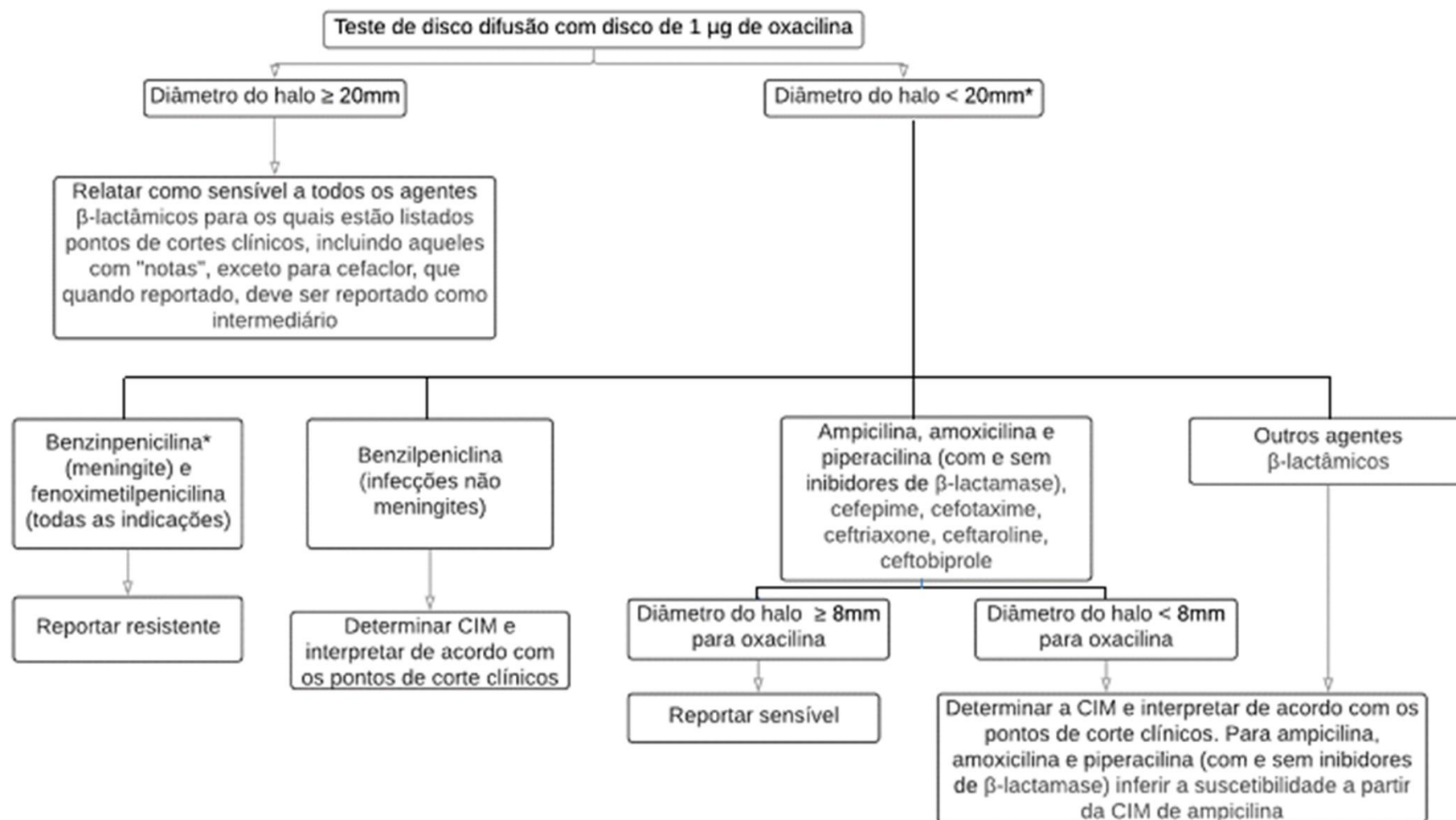
Ágar BHI
Escala 2 McFarland
48 h incubação

9

Streptococcus pneumoniae não sensíveis à penicilina

Detecção do mecanismo de resistência **é** necessária para categorização clínica de sensibilidade, **porém não para controle de infecção**

Triagem para resistência aos β -lactâmicos em *S. pneumoniae*



MUITO OBRIGADA PELA ATENÇÃO!

jukasuko@gmail.com