

FBF0351 – Controle Biológico de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos

Tema: Doseamento Microbiológico

Introdução

Os antibióticos são utilizados no tratamento de doenças infecciosas e estão entre as classes terapêuticas mais utilizadas, muitas vezes de maneira indiscriminada e irracional. A eficácia terapêutica de um antibiótico fundamenta-se na relação entre a sua concentração mínima inibitória do antibiótico e a curva de concentração plasmática em função do tempo. Há situações em que a margem entre dose ineficaz e dose tóxica (janela terapêutica) é relativamente pequena.

Muitos antibióticos são obtidos por a partir de processos fermentativos e/ou biotecnológicos, sendo constituídos por misturas de complexas com substâncias com estruturas químicas semelhante. Ainda devemos considerar as possibilidades de falsificações ou adulterações com substâncias com estrutura química semelhante, porém sem atividade antimicrobiana, o que pode levar a ineficácia do medicamento.

Diante do exposto, a dosagem microbiana apresenta-se como uma alternativa para a avaliação da qualidade de medicamentos contendo antibióticos ou fatores de crescimento. A dosagem microbiana baseia-se no fato da atividade de antibióticos poder ser demonstrada por meio de seu efeito inibitório no crescimento microbiano, em condições analíticas apropriadas. Uma redução da atividade antimicrobiana pode revelar alterações não detectadas por métodos físico-químicos. Dois métodos são usualmente empregados na dosagem microbiológica de antibióticos: 1) o ensaio de difusão em agar e 2) o ensaio turbidimétrico.

Ensaio de difusão em agar

Formação dos halos de inibição

O ensaio de difusão em agar emprega placas de Petri contendo meio de cultura sólido previamente inoculado com microrganismo-teste sensível ao antibiótico ensaiado e relaciona o tamanho do halo de inibição de crescimento com a dose de antibiótico ensaiado. Em outras palavras, sob condições analíticas padronizadas e controladas, quanto maior a dose de antibiótico ensaiada, maior o tamanho do halo de inibição. É fundamentalmente um método físico, que empregado o microrganismo-teste como revelador.

A formação do halo de inibição ocorre em função de dois fenômenos que ocorrem simultaneamente: 1) a difusão do antibiótico e 2) o crescimento microbiano. A difusão do antibiótico ocorre de acordo com a lei de difusão de Fick, devido a existência de gradiente de concentração. No momento em que o halo de inibição se forma, o tamanho do halo (x^2) pode ser explicado em função da constante de difusão do antibiótico (D – especificada para cada substância), das concentrações crítica (C') e inicial (C_0) do antibiótico, e do tempo de difusão (t'). Concomitantemente a difusão do antibiótico, ocorre o crescimento microbiano. O crescimento microbiano pode ser explicado em função da carga microbiana inicial (N_0), da velocidade de geração (G), do tempo de fase lag (L) e do tempo de crescimento (t). No momento em que o halo se forma (t'), a carga microbiana atinge uma população crítica (N').

Quando pertinente, pode se priorizar o fenômeno de difusão em detrimento do crescimento microbiano (pré-difusão), mantendo as placas sob refrigeração. A pré-difusão resulta em halos maiores, sendo útil para a análise de antibióticos de baixa difusão. Por outro lado, o crescimento microbiano pode ser priorizado em detrimento a difusão do antibiótico (denominado pré-incubação) (h), incubando-se as placas antes de distribuir as soluções de antibiótico. A pré-incubação resulta em halos menores, sendo útil quando o microrganismo-teste apresenta longo tempo de fase lag (L).

Os parâmetros críticos que definem a formação do halo de inibição (C' , N' e t') podem ser determinados experimentalmente em condições analíticas adequadas. Para determinar-se a C' , são realizados experimentos variando-se as C_0 . Os x^2 apresentam relação linear diretamente proporcional ao $\ln(C_0)$. Quando $x^2 = 0$, $C_0 = C'$. A inclinação da reta fornece uma estimativa de D . Para determinar-se N' , são realizados experimentos variando-se N_0 . Os x^2 apresentam relação linear inversamente proporcional ao $\log_2(N_0)$. Quando $x^2 = 0$, $N_0 = N'$. A inclinação da reta fornece uma estimativa de G . Para determinar-se o t' , são realizados experimentos variando-se h . Os x^2 apresentam relação linear inversamente proporcional ao h . Quando $x^2 = 0$, $h = t'$. Nesta situação, também é possível obter uma estimativa do L .

Fatores de influência

O microrganismo-teste empregado deve ser sensível ao antibiótico ensaiado e, sempre que possível, deve ser selecionado em função do espectro de ação do antibiótico e da relevância clínica do mesmo. O x^2 é inversamente proporcional a N_0 . Este fato pode ser explicado pois quanto maior a N_0 , menor será o t' para que se atinja a N' , e conseqüentemente, menor o t' de difusão do antibiótico. Recomenda-se a quantidade de

suspensão (proporção de inóculo) seja suficiente para resultar numa carga inicial da ordem de 10^6 UFC/mL. Esta carga microbiana inicial permite que o crescimento obtido seja denso o suficiente para a formação dos halos de inibição.

A composição quali/quantitativa do meio de cultura pode afetar a difusão e/ou o crescimento e, conseqüentemente, o x^2 . Altas concentrações de nutrientes como extrato de carne e extrato de levedura levam a aumento da velocidade de crescimento microbiano, o que resulta na diminuição dos x^2 . Por outro lado, o incremento da quantidade de agar no meio de cultura ocasiona a redução da velocidade de D, o que resulta na diminuição dos x^2 . Usualmente, recomenda-se empregar meios de cultura com pH entre 5,5 e 8,0, para que o crescimento microbiano não seja prejudicado. Alterações no pH do meio de cultura e/ou do diluente podem modificar estado de ionização do antibiótico e reduzir a atividade antimicrobiana.

A temperatura de incubação deve ser selecionada em função do microrganismo-teste utilizado. A incubação em temperaturas fora da faixa recomendada pode interferir na velocidade de crescimento do microrganismo-teste e, conseqüentemente, no tamanho do halo de inibição.

Conforme explicado anteriormente, os x^2 podem ser alterados quando empregados os recursos de pré-difusão ou de pré-incubação. As alterações dos x^2 podem ser explicadas pelo fato da pré-difusão e da pré-incubação favorecerem os fenômenos de difusão do antibiótico e de crescimento microbiano, respectivamente. Devido ao favorecimento do fenômeno de difusão do antibiótico, o emprego da pré-difusão aumenta a inclinação da relação dose-resposta (x^2 em função do $\ln(C_0)$). Por outro lado, o emprego da pré-incubação reduz a inclinação da relação dose-resposta (x^2 em função do $\ln(C_0)$), uma vez que favorece o crescimento microbiano em detrimento da difusão de antibiótico.

Procedimento para realização do ensaio

O procedimento para a realização do ensaio de difusão em agar envolve as seguintes etapas:

1) preparo do inóculo: Podem ser empregadas bactérias vegetativas, bactérias esporuladas ou leveduras. Obtém-se uma cultura recente em meio de cultura inoculado e incubado. No momento da realização do ensaio, o crescimento obtido é suspenso em solução fisiológica estéril. A suspensão é padronizada em espectrofotômetro (25% de transmitância a 580 nm).

2) preparo das placas: Inicialmente, transfere-se quantidade apropriada de meio de cultura estéril para as placas de Petri (camada base). Em seguida, adiciona-se volume

de meio de cultura previamente inoculada com suspensão microbiana na proporção adequada (camada inoculada). Alternativamente, as placas de Petri podem ser preparadas em sistema de monocamada

3) distribuição das soluções de antibióticos: As soluções de antibiótico podem ser aplicadas à superfície do meio de cultura empregando-se discos de papel de filtro, cilindros de aço inox, “templates”, ou em orifícios feitos diretamente na superfície do agar.

4) incubação das placas: A incubação das placas de Petri usualmente ocorre em temperatura entre 30 e 38°C por período de 18 h. Quando pertinente, os recursos de pré-incubação ou pré-difusão podem ser empregados.

5) determinação do tamanho dos halos de inibição de crescimento: Pode ser realizada empregando-se régua ou paquímetro calibrados, leitores de halos analógicos (régua acoplada a sistema para de lentes e espelhos) ou digital (câmera acoplada a software de análise da imagem).

A partir das determinações dos tamanhos dos halos de inibição, calcula-se a potência do antibiótico contido na amostra empregando-se um dos delineamentos experimentais que serão descritos a seguir.

Delineamentos experimentais

Devido ao grande número de fatores que afetam a difusão do antibiótico e/ou o crescimento microbiano, é esperado que os tamanhos dos halos de inibição apresentem uma alta variabilidade. Por este motivo, a determinação da atividade (potência) de um antibiótico numa amostra (medicamento) deve ser realizada em comparação com os resultados obtidos com substância química de referência, em condições experimentais idênticas (ensaiada em paralelo).

Também é recomendável que seja empregado delineamento experimental que permita controlar (ou reduzir) as fontes de variabilidade do ensaio de difusão, além de fornecer informações quanto a validade da potência calculada. Usualmente, são empregados dois tipos de delineamentos experimentais:

1) os ensaios simétricos ou balanceados: empregam o mesmo número de doses para as preparações de padrão e amostra (3 x 3). Todas as doses de ambas as preparações (padrão e amostra) são distribuídas em mesma placa (réplica), o que controla a variabilidade entre as placas. O cálculo da potência é feito pela distância entre as retas de amostra e de padrão. Para que o valor obtido de potência seja válido, os parâmetros de significância da regressão, linearidade e paralelismo devem ser atendidos.

2) os ensaios de interpolação em curva-padrão: empregam cinco doses de padrão e apenas uma dose de amostra (5 x 1). As preparações são distribuídas em placas diferentes, sendo que a dose mediana de padrão é empregada como fator de correção (em todas as placas). O cálculo da potência é obtido pela interpolação da resposta da amostra na curva de dose resposta obtida. Para que o valor obtido de potência seja válido, os parâmetros de significância da regressão e linearidade devem ser atendidos.

Redução do tempo de incubação (Métodos microbiológicos rápidos)

Estudos recentes relacionados a determinação dos parâmetros críticos relacionados ao ensaio de difusão em agar sugerem que os halos de inibição são formados após algumas poucas horas de incubação (entre 4 e 7 horas, dependendo do antibiótico ensaiado). Porém, faz-se necessário um período maior de incubação (cerca de 18 horas) para que os halos possam ser visualizados. O emprego de corante vital, como os sais de tetrazólio, possibilitam a visualização dos halos de inibição de crescimento em tempo reduzido (cerca de 5 horas).

Ensaio turbidimétrico

Princípio do método turbidimétrico

O ensaio turbidimétrico emprega tubos de ensaio contendo meio de cultura líquido previamente inoculado com microrganismo-teste e relacionada a intensidade do crescimento microbiano obtido (medido na forma de turbidez) com a dose de substância ensaiado. O ensaio turbidimétrico pode ser empregado para a análise de antibióticos ou fatores de crescimento.

A turbidez obtida é determinada por espectrofotometria (usualmente a 580 nm) em escala de densidade óptica (DO) ou percentagem de transmitância (T%). Quanto maior a concentração de antibiótico, menor será a turbidez (<DO, >%T). No caso de fatores de crescimento, quanto maior sua concentração, maior será a turbidez (>DO, <%T)

O emprego de meio líquido apresenta vantagens quanto a rapidez, facilidade operacional, e ausência de problemas relacionados a baixa difusão do antibiótico. Por outro lado, as desvantagens incluem a necessidade de equipamento para a leitura das respostas e a necessidade de cuidados quanto a contaminação grosseira ou coloração das amostras que possam interferir na leitura espectrofotométrica.

Fatores de influência

O microrganismo-teste empregado no ensaio turbidimétrico deve ser sensível ao antibiótico ou dependente do fator de crescimento ensaiados. É preferível que seja empregado microrganismo-teste que esteja em fase de crescimento exponencial, obtida empregando meio de cultura com composição semelhante ao do ensaio. No caso de fator de crescimento, é necessário que o mesmo esteja presente na composição do meio de preparo do inóculo, porém não deve ser presente no meio do ensaio. Desta forma, o crescimento microbiano deve ser centrifugado e lavado para eliminar resíduos de meio. Carga de microrganismo empregada da ordem de 10^6 UFC/mL. Quantidades inferiores demandam maior período de incubação. Por outro lado, quantidades superiores resultam em crescimento rápido sem que seja possível observar crescimento diferenciado.

A composição do meio de cultura e seu pH interferem no crescimento, alterando o período de incubação ideal para leitura espectrofotométrica. Meios suplementados com extrato de levedura favorecem o crescimento de *Staphylococcus aureus*, permitindo redução do tempo de incubação de 5h para 3,5h para a dosagem de bacitracina. O pH do meio de cultura constitui em aspecto importante pois pode alterar a atividade da substância ensaiada, além de podem interferir no crescimento microbiano.

A agitação evita a sedimentação das células microbianas e favorece a manutenção da concentração de oxigênio nos tubos. Por outro lado, a agitação vigorosa leva a formação de bolhas que podem prejudicar a leitura espectrofotométrica. Quando a coloração da amostra interfere na leitura espectrofotométrica, procede-se com leitura dos tubos no início e ao final do período de incubação, com a finalidade de determinar a variação de leitura decorrente do crescimento microbiano.

A temperatura de incubação deve ser selecionada em função do microrganismo-teste empregado, sendo recomendada a utilização de banhos de água termostatizados (banhos-maria) por apresentarem melhor uniformidade de temperatura em comparação as estufas bacteriológicas. Quanto ao tempo de incubação, relação dose-resposta com baixa inclinação são obtidas com períodos curtos (devido a crescimento insuficiente) longos (devido crescimento intenso).

A leitura espectrofotométrica da turbidez (DO ou %T) é o recurso mais empregado, porém podem ser empregadas a determinação da massa seca, o número total de microrganismos viáveis, a quantidade de nitrogênio total; a quantidade de dióxido de carbono liberado, o consumo de oxigênio, dentre outros.

Procedimento para realização do ensaio

O procedimento para a realização do ensaio turbidimétrico envolve as seguintes etapas:

1) preparo do inóculo: deve ser preparado em meio de cultura similar ou idêntico ao meio de ensaio. O procedimento consiste em inocular meio líquido que será incubado por tempo e temperatura adequados. No caso de análise de fator de crescimento, a suspensão deve ser centrifugada e lavada para eliminar resíduo de meio. Se necessário, diluir a suspensão de forma a obter 25% a 580 nm.

2) preparo dos tubos de ensaio: preparados transferindo-se volumes das preparações de padrão e amostra. Em seguida, adiciona-se meio de cultura previamente inoculado com suspensão de inóculo em proporção adequada. A incubação dos tubos ocorre em banho de água termostaticado com agitação, por tempo e temperatura adequados.

3) leitura espectrofotométrica da turbidez: após a incubação, procede-se a leitura espectrofotométrica da turbidez (DO ou %T) e calcula-se a potência da amostra.

Ensaio turbidimétrico em microplacas com leitura cinética

Recentemente, diversos estudos demonstram a realização de ensaios de dosagem de antibióticos em meio líquido empregando sistemas de microplacas. Dentre as vantagens destacam-se a quantidade reduzida de material, o menor volume de resíduos gerados, a possibilidade de análise de um grande número de amostras simultaneamente, a disponibilidade de equipamentos integrados para incubação, agitação e leitura espectrofotométrica durante todo o ensaio (leitura cinética). Considerando-se leitura cinética, podem ser utilizados modelos de cálculo baseados na ASC de crescimento (método integral), no tempo necessário para incremento de densidade óptica (tempo de reação), e utilizando-se regressão por mínimos quadrados parciais (PLS). Adicionalmente, podem ser utilizados corantes vitais (tais de tetrazólio ou resazurina), com a finalidade de reduzir do tempo de incubação dos ensaios.