

## Preparação de meios para o teste de disco-difusão do EUCAST e para a determinação dos valores de concentração inibitória mínima pelo método de microdiluição em caldo

### A. Meios para teste de disco-difusão:

#### Ágar Mueller-Hinton (MHA) e MHA suplementado com sangue desfibrinado de cavalo e $\beta$ -NAD (MH-F)

O ágar MH é utilizado para o teste de disco-difusão de organismos não exigentes.

**Ágar MH-F**, MH suplementado com 5% de sangue desfibrinado mecanicamente de cavalo e 20 mg/L de  $\beta$ -NAD. É utilizado para testar *Streptococcus* spp. (Incluindo *S. pneumoniae*), *Haemophilus* spp., *Moraxella catarrhalis*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Pasteurella multocida*, *Corynebacterium* spp. e vários outros organismos exigentes.

As placas de meio de cultura podem ser compradas prontas para uso a partir de fontes comerciais ou preparadas localmente como se segue:

Reagentes	
1.	Pó do MHA de fonte comercial.
2.	Sangue desfibrinado mecanicamente de cavalo.
3.	$\beta$ -nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NAD- $\beta$ ), pureza $\geq 98\%$

Preparação da solução estoque de $\beta$ -NAD	
1.	Dissolver o $\beta$ -NAD em água deionizada estéril para uma concentração de 20 mg/mL.
2.	Esterilizar a solução utilizando membrana filtrante de 0,22 $\mu$ m.
3.	A solução estoque deve ser armazenada em temperatura $\leq -20$ ° C em alíquotas e descongelada quando necessário. Não voltar a congelar solução não utilizada.

<b>Preparação das placas</b>	
1.	Preparar e autoclavar o MHA de acordo com as instruções do fabricante.
2.	Deixar a temperatura baixar para 42-45°C.
3.	Para preparo do MH-F, adicionar assepticamente 50 mL de sangue desfibrinado mecanicamente de cavalo e 1 ml de solução β-NAD para cada litro de meio. Misture bem e dispense imediatamente.
4.	Dispensar em placas de Petri estéreis para obter uma profundidade média de 4,0 ± 0,5 mm (cerca de 25 mL em uma placa circular de 90 mm, 31 ml em uma placa circular de 100 mm, 71 mL em uma placa circular de 150 mm, 40 mL em uma placa quadrada 100 mm).
5.	Deixar o ágar solidificar antes de mover as placas.
6.	A superfície do ágar deve estar seca antes do uso. A necessidade ou não de secagem e o tempo necessário para secar a superfície do ágar depende das condições de armazenamento e de secagem. Não secar as placas excessivamente.

<b>Armazenamento de placas de ágar</b>	
1.	Estocar as placas em caixa plásticas ventiladas na temperatura de 8-10°C. Caso as placas sejam armazenadas por mais de sete dias, um armazenamento alternativo, tal como o armazenamento de placas a 4-8 °C em sacos plásticos herméticos pode ser necessário.
2.	Para placas preparadas no laboratório, a secagem da placa, as condições de armazenamento e o prazo de validade devem ser determinados como parte do programa de garantia de qualidade do laboratório.
3.	Placas preparadas comercialmente devem ser armazenadas como recomendado pelo fabricante e devem ser utilizadas dentro do prazo de validade.
4.	Para placas de ágar MH-F (comerciais ou preparadas no laboratório) armazenadas em sacos plásticos ou outros recipientes fechados, pode ser necessário secá-las antes da utilização. Isto visa evitar o excesso de umidade, que pode resultar em halos com bordas distorcidas e / ou névoa no interior dos halos.

<b>Controle de qualidade</b>	
1	Utilizar um eletrodo de pH de superfície para verificar que o pH esteja dentro do intervalo de 7,2-7,4.
2	Verificar se a profundidade do ágar é de 4,0 mm ± 0,5 mm no centro da placa. <b>Para isso utilizar estilete e realizar corte a 90° em relação à superfície do meio.</b>
3	Verificar se o meio suporta um bom crescimento das cepas de controle dos microrganismos a serem testados.
4	Verificar se os halos de inibição estão dentro dos limites estabelecidos para todas as combinações de agentes antimicrobianos/bactérias utilizadas.

## B. Meios para determinação da CIM pelo método de microdiluição em caldo Mueller-Hinton (MHB) cátion-ajustado e MHB suplementado com sangue lisado de cavalo e $\beta$ -NAD (caldo MH-F)

**Caldo MH**, caldo Mueller-Hinton cátion-ajustado não suplementado é utilizado para testes de microdiluição em caldo de microrganismos não exigentes de acordo com a norma ISO 20776-1, de 2006.

**Caldo MH-F**, caldo MH suplementado com 5% de sangue lisado de cavalo e 20 mg/L de  $\beta$ -NAD, é utilizado para testar *Streptococcus* spp. (incluindo *S. pneumoniae*), *Haemophilus* spp., *Moraxella catarrhalis*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Pasteurella multocida*, *Corynebacterium* spp. e vários outros microrganismos exigentes.

O caldo MH-F é preparado como se segue:

Reagentes	
1.	MHB cátion-ajustado de origem comercial.
2.	Sangue lisado de cavalo a 50%.
3.	$\beta$ -nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NAD- $\beta$ ), pureza $\geq 98\%$ .

Preparação da solução estoque de sangue lisado de cavalo a 50%	
1.	Diluir assepticamente o sangue de cavalo com uma quantidade igual de água deionizada estéril.
2.	Congelar o sangue a $-20^{\circ}\text{C}$ durante a noite e descongelar. Repetir o ciclo até que as células sejam completamente lisadas (três ciclos são geralmente suficientes mas, a norma ISO 20776-1 sugere que até sete ciclos podem ser necessários).
3.	Clarificar a solução de sangue lisado de cavalo a 50% por centrifugação. Uma solução clara é essencial para a leitura. A falha em clarificar a solução pode ser devido à lise ou centrifugação inadequadas. Repetir a centrifugação pode melhorar a limpidez da solução.
4.	A solução estoque deve ser armazenada em temperatura $\leq -20^{\circ}\text{C}$ em alíquotas e descongelada quando necessário. Não voltar a congelar solução não utilizada.

### Preparação da solução estoque de $\beta$ -NAD

1.	Dissolver o $\beta$ -NAD em água deionizada estéril para uma concentração de 20 mg/mL.
2.	Esterilizar a solução utilizando membrana filtrante de 0,22 $\mu$ m.
3.	A solução estoque deve ser armazenada em temperatura $\leq -20$ °C em alíquotas e descongelada quando necessário. Não voltar a congelar solução não utilizada.

4

### Preparação do caldo MH-F

1.	Preparar e autoclavar o MHB cátion-ajustado de acordo com as instruções do fabricante, com 100 ml a menos de água deionizada para cada litro de meio a ser preparado.
2.	Deixar a temperatura do meio baixar para 42-45°C.
3.	Adicionar asepticamente 100 mL de sangue lisado de cavalo a 50% e 1 mL de solução estoque de $\beta$ -NAD por litro de meio e homogeneizar bem.
4.	Distribuir o caldo MH-F em tubos com tampa de rosca estéreis.

### Estocagem do caldo MH-F

1.	Estocar o caldo MH-F a 4-8°C.
2.	As condições de armazenamento e prazo de validade devem ser determinadas como parte do programa de garantia de qualidade do laboratório. É esperada uma estabilidade de três meses.

### Controle de qualidade

1	Verificar se o pH está dentro do intervalo 7,2-7,4.
2	Verificar se o meio suporta um bom crescimento das cepas de controle dos microrganismos a serem testados.
3	Verifique se as CIMs estão dentro dos limites estabelecidos para todas as combinações de agentes antimicrobianos/bactérias utilizadas.