

Versão para português em 24/6/2021

Versão 6.0 do EUCAST– janeiro/2020

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

Alterações em relação a versão anterior (v. 5.0)

A. Meios para o teste de disco-difusão

Seção	Alterações
Introdução	Adicionados requisitos para o meio ágar Mueller-Hinton

B. Meios para determinação da CIM pelo método de microdiluição em caldo

Seção	Alterações
Introdução	Norma ISO 20776-1 atualizado para a versão 2019
Introdução	Adicionados requisitos para o caldo Mueller-Hinton

A. Meios para o teste de disco-difusão:

Ágar Mueller-Hinton (MH) e ágar MH suplementado com sangue desfibrinado de cavalo e β -NAD (MH-F)

Ágar MH, ágar Mueller-Hinton não suplementado, é utilizado para o teste de disco-difusão de microrganismos não exigentes.

Ágar MH-F, MH suplementado com 5% de sangue de cavalo desfibrinado mecanicamente e 20 mg/L de β -NAD, é utilizado para testar *Streptococcus* spp. (incluindo *S. pneumoniae*), *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* e *C. coli*, *Pasteurella multocida*, *Corynebacterium* spp., *Aerococcus sanguinicola* e *A. urinae* e *Kingella kingae*.

As placas de meio de cultura podem ser preparadas no laboratório a partir de meio desidratado ou compradas prontas para uso de fontes comerciais. O meio Mueller-Hinton desidratado deve atender aos requisitos de especificação técnica da norma ISO, ISO/TS 16782, de 2016 e aos critérios de controle de qualidade publicados pelo BrCAST-EUCAST.

As placas de ágar MH e MH-F são preparadas como a seguir:

1. Reagentes	
1.1	Pó do ágar MH de fonte comercial.
1.2	Sangue de cavalo desfibrinado mecanicamente.
1.3	β -nicotinamida-adenina-dinucleotídio (β -NAD), pureza $\geq 98\%$.

2. Preparação da solução estoque de β-NAD	
2.1	Dissolver o β -NAD em água deionizada estéril para uma concentração de 20mg/mL.
2.2	Esterilizar a solução utilizando membrana filtrante de 0,2 μ m.
2.3	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.

3. Preparação das placas de ágar	
3.1	Preparar e autoclavar o ágar MH de acordo com as instruções do fabricante.
3.2	Deixar a temperatura baixar para 42-45°C.
3.3	Para preparo do ágar MH-F, adicionar asépticamente 50mL de sangue de cavalo desfibrinado mecanicamente e 1mL de solução estoque de β-NAD para cada litro de meio. Misturar bem e dispensar imediatamente.
3.4	Dispensar em placas de Petri estéreis para obter uma profundidade média de 4,0 ± 0,5 mm (cerca de 25mL em uma placa circular de 90mm, 31mL em uma placa circular de 100 mm, 71mL em uma placa circular de 150mm, 40mL em uma placa quadrada 100 mm). Verificar o volume correto com base nas dimensões reais da placa de Petri utilizada. As dimensões da placa podem variar entre diferentes fabricantes.
3.5	Deixar o ágar solidificar antes de mover as placas.
3.6	A superfície do ágar deve estar seca antes do uso. Nenhuma gota de água deve ser visível na superfície do ágar ou na parte interna da tampa. Se necessário, secar as placas em temperatura entre 20-25°C <i>overnight</i> ou a 35°C, com a tampa removida por 15 minutos. Não secar excessivamente as placas.

4. Armazenamento de placas de ágar	
4.1	Armazenar as placas preparadas no laboratório a 4-8 °C.
4.2	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.
4.3	As placas adquiridas comercialmente devem ser armazenadas conforme recomendado pelo fabricante e devem ser utilizadas dentro do prazo de validade.
4.4	Para placas de ágar (adquiridas comercialmente 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.

5. Controle de qualidade	
5.1	Utilizar um eletrodo de pH de superfície para verificar que o pH esteja dentro do intervalo de 7,2-7,4.
5.2	Verificar se a profundidade do ágar é de 4,0mm ± 0,5mm no centro da placa. Para isso utilizar estilete e realizar corte transversal em relação à superfície do meio.
5.3	Verificar se o meio suporta um bom crescimento das cepas controle dos microrganismos a serem testados.
5.4	Realizar disco-difusão para cepas de controle de qualidade de acordo com as recomendações do BrCAST/EUCAST e verificar se os halos de inibição estão dentro dos limites estabelecidos para todas as combinações de agentes antimicrobianos/bactérias utilizadas (Tabelas de CQ BrCAST/EUCAST).

B. Meios para determinação da CIM pelo método de microdiluição em caldo

Mueller-Hinton cátion-ajustado (MHB) e MHB suplementado com sangue lisado de cavalo e β -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 2019.

Caldo MH-F, caldo MH cátion-ajustado suplementado com 5% de sangue lisado de cavalo e 20mg/L de β -NAD, é utilizado para testar *Streptococcus* spp. (incluindo *S. pneumoniae*), *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* e *C. coli*, *Pasteurella multocida*, *Corynebacterium* spp., *Aerococcus sanguinicola* e *A. urinae*, *Kingella kingae* e vários outros microrganismos fastidiosos.

O caldo MH não suplementado pode ser adquirido pronto para uso de fontes comerciais ou ser preparado no laboratório seguindo as instruções dos fabricantes. O caldo MH deve atender aos requisitos de especificação técnica da norma ISO, ISO/TS 16782, de 2016 e aos critérios de controle de qualidade publicados pelo BrCAST/EUCAST.

O caldo MH-F é preparado como a seguir:

1. Reagentes	
1.1	Caldo MHB cátion-ajustado de origem comercial.
1.2	Sangue lisado de cavalo a 50%.
1.3	β -nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (β -NAD), pureza $\geq 98\%$.

2. Preparação da solução estoque de sangue lisado de cavalo a 50%	
2.1	Diluir assepticamente o sangue de cavalo desfibrinado mecanicamente com uma quantidade igual de água deionizada estéril.
2.2	Congelar o sangue a -20°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).

Versão para português em 24/6/2021

Versão 6.0 do EUCAST– 01/2020

2.3	Clarificar a solução de sangue lisado de cavalo a 50% por centrifugação e descartar o sedimento. 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 clarificação da solução sobrenadante.
2.4	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.

3. Preparação da solução estoque de β -NAD

3.1	Dissolver o β -NAD em água deionizada estéril para uma concentração de 20mg/mL.
3.1	Dissolver o β -NAD em água deionizada estéril para uma concentração de 20mg/mL.
3.3	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.

4. Preparação do caldo MH-F

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

5. Estocagem do caldo MH-F

5.1	Armazenar o caldo MH-F a 4-8°C.
5.2	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.

6. Controle de qualidade

6.1	Verificar se o pH está dentro do intervalo 7,2-7,4.
6.2	Verificar se o meio suporta um bom crescimento das cepas controle dos microrganismos a serem testados.
6.3	Verificar se as CIMs estão dentro dos limites estabelecidos para todas as combinações de agentes antimicrobianos/bactérias utilizadas (Tabelas de CQ BrCAST/EUCAST).