

Protocolo de referência EUCAST para determinação de CMI de agentes antituberculosos contra isolados do complexo *Mycobacterium tuberculosis*

Anexo

Versão 8.2. 29 de janeiro de 2025

O protocolo de referência consiste em dois documentos:

1. O documento principal apresentando os princípios do método de referência EUCAST para determinação de Concentração Mínima Inibitória (CMI) de antimicrobianos contra isolados do complexo *Mycobacterium tuberculosis*
2. Um anexo apresentando exemplos de protocolos laboratoriais práticos e detalhados.

Descrição da placa de microtitulação e seu layout

1. Deve ser usada uma microplaca de poliestireno com 96 poços em forma de U e com uma superfície do fundo dos orifícios não tratada. **Não usar** placas de polipropileno ou outro material plástico ou placas com uma superfície tratada que possam afetar a atividade do antimicrobiano.
2. As microplacas preparadas com meio de cultura e antimicrobianos, devem ser inoculadas e incubadas no mesmo dia.
3. Para cada antimicrobiano a determinação da CMI é feita testando pelo menos oito (8) concentrações em poços separados.
4. Os poços periféricos da microplaca, exceto uma linha reservada para controles negativos, devem ser preenchidos com 200 µL de água destilada estéril (dH₂O) para evitar a dessecação durante a incubação, exceto uma linha reservada para controles negativos (Figura 1).
5. Veja as propostas de layout das placas nas Figuras 1A e 1B.
- 6.

Preparação do meio de cultura

1. Prepare o meio Middlebrook 7H9 (7H9) acordo com as instruções do fabricante com uma concentração final de 0,2% v/v glicerol (**Tween 80 não deve ser usado**). Depois que o meio for autoclavado, resfrie até a temperatura ambiente e adicione, em condições estéreis Ácido Oleico, Albumina, Dextrose e Catalase (OADC) para atingir a concentração de 10%. Este será o meio 7H9- OADC 10% (7H9-OADC).

- É aconselhável realizar uma verificação de esterilidade do meio de cultura antes do uso.
2. Prepare os dois controles de crescimento (CC) diferentes (CC 100% e CC 1%) na microplaca.
 - a) Para a microplaca de teste com agentes solúveis em água, conforme ilustrado na Figura 1A, são testados dois CC 100% e dois CC 1% por cepa em nosso exemplo: cada CC consiste em 100 µL de meio 7H9-OADC, aos quais são adicionados 100 µL do inóculo bacteriano (100% ou 1%).
 - b) Para a microplaca de teste com agentes insolúveis em água, conforme ilustrado na Figura 1B, também há dois CC 100% e dois CC 1% por cepa testada, mas estes são preparados com e sem solvente, ou seja, CC 100% ± solvente e CC 1% ± solvente. Para os CCs com solvente, preparar 7H9-10% OADC com 2X a concentração do solvente.

Preparo dos antimicrobianos

- Uma solução estoque é preparada dissolvendo o antimicrobiano em um solvente apropriado, conforme recomendado no padrão **ISO-20776-1** ou, se não listado, segundo a recomendação do fabricante.
- Se um antimicrobiano não for 100% puro, deve-se calcular a quantidade de antimicrobiano a ser dissolvida em 10 mL de diluente de acordo com a potência, seguindo a fórmula:

$$m = \frac{V \times p}{P}$$

onde:

- **m** = massa do agente antimicrobiano (pó) em g;
- **p** = concentração da solução estoque em mg/L;
- **P** = potência do agente antimicrobiano (pó) em mg/g;
- **V** = volume do diluente em 1 litro.
-

Exemplo: um antimicrobiano com 67% de potência significa que há 670 mg de substância ativa por grama, enquanto 100% de potência significa 1000 mg/g. Portanto, no caso de 67% de potência, a quantidade pesada deve ser aumentada em 33%, ou seja, pesar 1,33 g em vez de 1 g.

- A solução estoque é preparada conforme descrito na Tabela 1 para antimicrobianos solúveis em água e na Tabela 2 para antimicrobianos insolúveis em água.
 - Exemplo: se for necessária uma solução estoque de 10.240 mg/L, devem ser dissolvidos 102,4 mg em 10 mL de água (ou outro solvente), caso a potência do agente seja de 100%.

- A solução estoque deve então ser alíquotada em frascos de 0,2 mL e pode ser armazenada a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por no máximo 12 meses, a menos que especificado de outra forma pelo fabricante.
- **Frascos descongelados não devem ser reutilizados.**
- Recomenda-se registrar o número de lote dos agentes, bem como a data de preparo da solução estoque.

Protocolo A: para agentes solúveis em água

- Preparar uma solução de trabalho 4X em duas etapas de diluição em 7H9-OADC, a partir de uma alíquota da solução estoque, conforme descrito na Tabela 1 (exemplo: amicacina, isoniazida e levofloxacino).
- Adicionar 100 μL de meio 7H9-OADC a todos os poços que receberão antimicrobiano, conforme mostrado na Figura 1A.
- Adicionar 100 μL da solução de trabalho 4X dos antimicrobianos aos poços correspondentes à concentração mais alta (antimicrobiano no poço C8 na Figura 1A)
 - **Atenção: não adicionar nenhum antimicrobiano aos poços de controle negativo e de crescimento (CC).**
- Fazer diluições 1:2 adicionando 100 μL da solução de antimicrobianos presentes na linha de maior concentração (antimicrobiano C8) à linha seguinte (antimicrobiano C7), aplicando o mesmo procedimento até os poços antimicrobiano C6–C1 e, por fim, descartar o excedente.
- Após as diluições seriadas (C8 até C1), cada poço deve conter 100 μL de 7H9-OADC e 100 μL da solução do antimicrobiano, resultando na concentração final correta.
- Garantir que todos os poços de controle de crescimento (CC 100% e CC 1%) e controle negativo contêm 200 μL do meio apropriado (com ou sem solvente, conforme o caso).
-
- A placa deve estar agora pronta para a adição do inóculo bacteriano, que será feito conforme descrito na seção de preparo do inóculo.

Protocolo B: para agentes insolúveis em água

(ex.: bedaquilina, clofazimina, delamanida e pretomanida dissolvidos em DMSO)

Considerações gerais

- Os antimicrobianos devem ser diluídos de acordo com as recomendações do fabricante.
- A solução estoque é preparada dissolvendo o agente insolúvel em água em 100% do solvente recomendado (ex.: DMSO).

- As soluções de trabalho são então preparadas diluindo-se a solução estoque em **7H9-OADC**.

Para evitar efeito inibitório sobre o crescimento bacteriano, a concentração final do solvente deve ser $\leq 1\%$ em todos os poços que contenham antimicrobiano e nos poços de controle de crescimento. Igualmente importante é que a proporção do solvente seja a mesma em todas as concentrações do antimicrobiano na microplaca.

Nas Tabelas 2A e 2B são mostrados exemplos de preparo das soluções de antimicrobiano com concentração final de 0,5% de DMSO. Este protocolo foi utilizado para os testes de bedaquilina, clofazimina, delamanida e pretomanida.

Controles e preparo:

- Controles negativos: conter 200 μL por poço de 7H9-OADC com e sem a concentração final do solvente, conforme mostrado na Figura 1B.
- Controles positivos: dois CC 100% e dois CC 1%, ambos cultivados em 7H9-OADC com e sem a concentração final do solvente:
 - 100 μL de 7H9-OADC são adicionados aos poços CC 1% e CC 100% que não contêm solvente.
 - 100 μL de 7H9-OADC com 1% de solvente são adicionados aos poços CC 1% e CC 100%, resultando em concentração final de 0,5% de solvente, conforme Figura 1B.
- **Preparação das soluções do antimicrobiano**
 - Preparar soluções estoque em 100% solvente com concentração 200X a desejada para o teste, se a concentração final do solvente for 0,5%.
 - Adicionar 10 μL desta solução estoque a 990 μL de 7H9-OADC para preparar soluções de trabalho 2X (contendo 1% de solvente).
 - Adicionar 100 μL de cada solução de trabalho 2X ao respectivo poço contendo antimicrobiano na microplaca. Isso deve ser feito separadamente para cada poço/concentração.
 - Após a adição de 100 μL do inóculo bacteriano, as concentrações finais dos antimicrobianos são 1X com 0,5% de solvente (ver Tabelas 2A, 2B e Figura 1B).

Biossegurança:

Para todas as etapas subsequentes, incluindo a leitura da CMI, devem ser seguidas as medidas adequadas de biossegurança no manuseio de culturas de *M. tuberculosis*, incluindo o uso de cabines de segurança biológica.

Referência: [WHO Laboratory biosafety manual, 4th edition.](https://www.who.int/publications/i/item/9789240011311)
<https://www.who.int/publications/i/item/9789240011311>

Preparo do inóculo bacteriano

1. Os isolados de *M. tuberculosis* a serem testados devem ser cultivados em meios sólidos (ágar Middlebrook 7H10 ou 7H11, Löwenstein-Jensen ou outros meios sólidos à base de ovo) e o inóculo preparado a partir de **culturas frescas (até 2 semanas após o aparecimento visível das colônias)**. A cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 deve ser incluída em cada rodada de testes como controle interno, e **o mesmo lote não deve ser utilizado após mais de cinco repiques em subcultivo**.
2. Adicione uma alça bacteriológica de 10 µL cheia de colônias em um tubo de vidro estéril com tampa de rosca (10–15 mL), contendo 5–10 esferas de vidro estéreis de 3 mm. Feche bem a tampa e agite no vórtex em alta velocidade por pelo menos 2 minutos. Quando os aglomerados estiverem bem dispersos adicione 5 mL de água destilada estéril fresca. Feche a tampa firmemente e homogeneíze o conteúdo do tubo no vórtex vigorosamente por mais 2 minutos. Aguarde 30 minutos para que os aglomerados restantes sedimentem.
3. Transfira o sobrenadante para um novo tubo de vidro estéril vazio, agite em vórtex por 30 segundos e então ajuste a turbidez para o equivalente a 10^7 bactérias/mL. Isso pode ser feito utilizando instrumentos previamente calibrados com a cepa de CQ, seja por meio da medição de absorbância em nefelômetro calibrado (ex.: McFarland 0,5 corresponde a 10^7 bactérias/mL para a cepa de CQ) ou utilizando espectrofotômetro calibrado com curva de concentração \log^{10} .
 - Se a densidade da suspensão estiver acima do valor alvo \pm DP (ex.: $0,5 \pm 0,05$), adicione água destilada estéril até atingi-lo.
 - Se estiver abaixo, é necessário reiniciar o processo a partir do passo 2, caso contrário as colônias não estarão suficientemente dissociadas.
 -

Observação: O equipamento utilizado para ajuste da densidade do inóculo (ex.: nefelômetro) validado preparando pelo menos cinco suspensões diferentes da cepa de CQ, assegurando que as contagens de UFC da diluição 1:100 (10^{-2}) da suspensão McFarland 0,5 estejam na faixa aceitável de 1×10^4 – 1×10^6 UFC/mL.

- Prepare uma diluição 1:100 da suspensão bacteriana em caldo 7H9-OADC, realizando duas diluições seriadas de dez vezes, conforme abaixo. O volume necessário de suspensão bacteriana para uma placa de teste é de 10 mL.
- Para a diluição 10^{-1} : adicione 1 mL da suspensão bacteriana McFarland 0,5 a 9 mL de 7H9-OADC e agite em vórtex até formar redemoinhos por pelo menos 30 segundos.
- Para a diluição 10^{-2} : adicione 1 mL da suspensão 10^{-1} a 9 mL de 7H9-OADC e agite em vórtex novamente.
 - A suspensão 10^{-2} será usada como inóculo para os poços contendo antimicrobiano e para o controle de crescimento 100% (CC 100%).
- 4. Adicionalmente, a partir da suspensão 10^{-2} , prepare também uma suspensão 10^{-4} , por meio de duas novas diluições seriadas:
 - Para a diluição 10^{-3} : adicione 1 mL da suspensão 10^{-2} a 9 mL de 7H9-OADC e agite em vórtex
 - Para a diluição 10^{-4} : adicione 1 mL da suspensão 10^{-3} a 9 mL de 7H9-OADC e agite em vórtex.
 - A suspensão 10^{-4} será usada como inóculo para o controle de crescimento 1% (CC 1%).

6. Adicione 100 μ L da suspensão 10^{-2} a cada um dos poços contendo (nos quais já haviam sido previamente adicionados 100 μ L das diluições do antimicrobiano, utilizando ponteiras estéreis, conforme indicado nas Figuras 1A e 1B, começando a adição pelo poço com a menor concentração do antimicrobiano. Alterne as ponteiras a cada poço ou utilize ponteiras novas para evitar contaminação.

O procedimento pode ser facilitado utilizando-se um reservatório descartável de inóculo e uma micropipeta multicanal.

7. A quantificação do inóculo pode ser realizada por contagem de UFC em ágar Middlebrook 7H10 ou 7H11:

- Utilizando uma micropipeta calibrada, adicione 10 μ L das diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} em placas de ágar de 90 mm e espalhe o inóculo de forma homogênea sobre a superfície do ágar (uma alça de Drigalski ou pérolas de vidro são úteis).
- Incube as placas a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ em ar ambiente, dentro de saco ou caixa (como usado rotineiramente no laboratório de micobacteriologia), para evitar a dessecação.

- Conte as colônias após 3 a 4 semanas de incubação, ou mais tempo se o isolado de *M. tuberculosis* for de crescimento muito lento.
- O alvo para o inóculo presente no poço da microplaca é de 10^4 UFC/poço (isto é, a concentração do CC 100% corresponde a 1×10^5 UFC/mL e a do CC 1% a 1×10^3 UFC/mL), com faixa aceitável nos poços de GC100% e contendo antimicrobiano de 1×10^3 a 1×10^5 UFC/poço, ou seja, correspondendo a $1 \times 10^4 - 1 \times 10^6$ UFC/mL.

Resultados esperados para a cepa CQ e para a maioria das cepas ao semear 10 μ L das seguintes diluições da suspensão McFarland 0,5:

- **Diluição 10^{-2} (CC 100%)** → cerca de 1000 colônias (entre 100 e 10.000), resultando em crescimento confluyente.
- **Diluição 10^{-3}** → cerca de 100 colônias (entre 10 e 1000), contável se estiver na faixa inferior.
- **Diluição 10^{-4} (CC 1%)** → cerca de 10 colônias (entre 0–1 e 100), facilmente contáveis.

Se ao menos um dos resultados de diluição for um número contável, a contagem do inóculo deve ser obtida pelo cálculo:

$$N \text{ UFC/mL} = n \text{ colônias} \times 10^a$$

onde “a” é o fator de diluição em \log^{10} . (Ver Tabela 3 e Figura 2 como referência).

Incubação das placas e determinação da CMI

1. Após a inoculação, cubra as microplacas com tampa plástica (pode-se fixar fita adesiva nas laterais, se necessário) e coloque-as em sacos ou caixas plásticas, como usado rotineiramente no laboratório de micobacteriologia. Incube a $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ em ar ambiente (sem CO_2).
2. As placas de ágar para contagem do inóculo também devem ser incubadas nas mesmas condições.
3. Para evitar o ressecamento do ágar e das microplacas, pode-se adicionar água estéril ao reservatório da caixa ou utilizar outro método que impeça a dessecação.
4. Para antimicrobianos fotossensíveis (ex.: delamanida), as placas devem ser incubadas protegidas da luz.
5. Os controles negativos devem apresentar ausência de crescimento para que o teste seja válido.
6. **Uma inoculação em ágar sangue pode ser feita como controle adicional para verificar ausência de contaminação por outras bactérias ou fungos.**
7. As microplacas são lidas a olho nu, com auxílio de espelho invertido e sem magnificação.
 - Se for utilizado equipamento automatizado de leitura, este deve ser calibrado utilizando a leitura visual como referência.

- Recomenda-se que a leitura seja feita por duas pessoas diferentes, especialmente quando a determinação da CMI for difícil (ex.: presença de crescimento pontual).
 - Orientação geral de leitura: não considerar crescimento pontual; caso ele seja consistentemente presente mesmo após repetição do teste e monitoramento do inóculo, reportá-lo separadamente.
8. As datas de leitura são o 7º e o 14º dia, com a opção de leitura também no 10º dia (entre o 9º e o 11º dia). **Assim que houver crescimento visível do CC 100% e do CC 1%, a CMI deve ser registrada.**

Orientações operacionais

- **Dia 7:**
Leia a placa após 7 dias de incubação. Verifique ausência de contaminação (controles negativos e placa de ágar sangue) e observe o CC 100%.
 - Se o CC 100% for **positivo**, observe o CC 1%. Se o CC 1% também for positivo, registre a CMI em mg/L e nenhuma leitura posterior será necessária (situação rara, já que normalmente apenas o CC 100% é positivo no dia 7). Caso contrário, reincube a microplaca até o 14º dia.
- **Dia 10 (opcional):**
Se o CC 100% for positivo no 7º dia, pode-se fazer uma leitura opcional no 10º dia (ou no 9º ou 11º, por motivos logísticos).
 - Se o CC 1% for **positivo** nesse dia, registre a CMI em mg/L e nenhuma leitura adicional será necessária.
 - Caso contrário, reincube a microplaca
- **Dia 14:**
- Leia a microplaca após 14 dias de incubação, a menos que o CC 100% e o CC 1% já tenham sido positivos antes dessa data.
 - Se o CC 100% ou o CC 1% ainda forem negativos, pode-se reincubar até no máximo 21 dias.
 - Depois disso, o teste deve ser repetido, verificando a preparação do inóculo.
- Assim que houver crescimento visível do CC 100% e do GC 1%, a CMI deve ser registrada.

Comentários

- Para a cepa de CQ e para a maioria das cepas de *M. tuberculosis*, há um intervalo de 3 a 7 dias entre o crescimento visível do CC 100% e o do CC 1%.
- O tempo mediano para positividade do CC 1% na cepa de CQ com inóculo adequado é de 10 dias (variando de 7 a 14 dias).
- O CC 1% mostra crescimento visível com intensidade mais fraca que o CC 100%.

Definição da CMI

1. A CMI corresponde à menor concentração do antimicrobiano em que não se observa crescimento visível quando o CC 100% e o CC 1% apresentam crescimento visível.
 - O valor alvo da CMI e sua faixa para a cepa CQ estão indicados na **Tabela 4**.
2. A CMI deve ser relatada em mg/L.
3. Recomenda-se registrar o dia da leitura da CMI pois isso indica a densidade do inóculo e a capacidade de crescimento do isolado no meio.
 - Também deve ser registrada a estimativa de UFC/mL por poço, já que geralmente se correlaciona com o tempo até a positividade.

○

Tabela 1. Preparação dos antimicrobianos solúveis em água (amicacina, isoniazida, levofloxacino) avaliados pelo protocolo de referência da EUCAST-AMST contra *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294.

Antimicrobiano	Código Sigma ¹	Solvente	Concentração estoque (mg/L)	Diluição 1 (7H9) ³	Diluição 2 (7H9-OADC)	Concentração de trabalho (4X) em 7H9-OADC (mg/L) – 1 mL = 10 placas	Concentração final (mg/L) em 7H9-OADC
Amicacina	A1774	H ₂ O	10.240	1:64	1:5	32	8 – 0,06
Isoniazida	I3377	H ₂ O	10.240	1:64	1:40	4	1 – 0,008
Levofloxacino	28266	²	10.240	1:64	1:10	16	4 – 0,03

¹Em 29/01/2025, verificar no momento da compra.

² Adicionar o pó a 50% do volume total de H₂O destilada e, em seguida, adicionar lentamente NaOH 1 mol/L até dissolver. Depois, completar com H₂O destilada até o volume final.

³ A adição de OADC não é necessária nesta etapa, pois será feita apenas na diluição posterior.

Tabela 2A. Preparação de agentes antimicrobianos insolúveis em água (delamanida, bedaquilina, pretomanida e clofazimina) avaliados pelo protocolo de referência da EUCAST-AMST contra *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294.

Antimicrobiano	Produto/Lote do fornecedor ¹	Solvente	Solução-mãe (mg/L)	Soluções estoque 200X (mg/L) preparadas em 100% DMSO	Soluções de trabalho 2X (mg/L) preparadas adicionando 10 µL da solução estoque a 990 µL de 7H9-OADC (1 mL ≈ 10 placas)	Concentração final (mg/L) em 7H9-OADC
Bedaquilina ²	BEI, ARP-12702	DMSO	10.000	200 – 1,6	2 – 0,016	1 – 0,008
Clofazimina ³	Sigma, SLBV7150	DMSO	800	400 – 3,2	4 – 0,03	2 – 0,016
Delamanida ⁴	BEI, NR-51636	DMSO	10.000	12,5 – 0,1	0,12 – 0,001	0,06 – 0,0005
Pretomanida	BEI, NR-59591	DMSO	10.000	400 – 3,2	4 – 0,03	2 – 0,016

¹Em 29/01/2025, verificar no momento da compra.

² A bedaquilina é fornecida como sal de fumarato, portanto verificar a potência (ver acima).

³ A clofazimina tende a precipitar em concentrações mais altas da solução-mãe.

⁴ A delamanida é sensível à luz e deve, por exemplo, ser mantida em tubo protegido com folha de alumínio.

Fonte adicional: [BEI Resources](#)

Tabela 2B. Preparo de soluções estoque e de trabalho de antimicrobianos insolúveis em água e que requerem um solvente específico. Exemplos de preparo utilizados para delamanida, bedaquilina, pretomanida e clofazimina. As concentrações estão em mg/L.

Número da diluição	Soluções estoque 200 X com 100% solvente	Soluções de trabalho (2X antimicrobiano, 1% solvente)	Concentração final no poço (1X antimicrobiano, 0,5% solvente)
1	400	4	2
2	200	2	1
3	100	1	0,5
4	50	0,5	0,25
5	25	0,25	0,125
6	12,5	0,125	0,06
7	6,3	0,06	0,03
8	3,2	0,03	0,016
9	1,6	0,016	0,008
10	0,8	0,008	0,004
11	0,4	0,004	0,002
12	0,2	0,002	0,001
13	0,1	0,001	0,0005

Tabela 3. Resumo dos inóculos utilizados no protocolo para determinação da CMI do complexo *M. tuberculosis*.

Etapas do protocolo	Alvo	Faixa
Preparo de uma suspensão McFarland (McF) 0,5 a partir de colônias frescas	10 ⁷ UFC/mL	± 1 log
Inóculo para CMI : diluição 10 ⁻² da suspensão McF 0,5 preparada em duas etapas de diluição	10 ⁵ UFC/mL	± 1 log
Inóculo CC100%: 100 µL do inóculo da CMI por poço	10 ⁴ UFC	10 ² – 10 ⁴
Inóculo CC 1%: diluição 10 ⁻² do GC100% preparada em duas etapas de diluição, com 100 µL adicionados por poço	10 ² UFC	1 – 10 ²
Contagem do inóculo: 10 µL da diluição 10 ⁻² da suspensão McF 0,5	10 ³ UFC / 1000** colônias por placa	10 ² – 10 ⁴ / 100* – 10000**
Contagem do inóculo: 10 µL da diluição 10 ⁻³ da suspensão McF 0,5	10 ² UFC / 100* colônias por placa	10 ¹ – 10 ³ / 10 – 1000**
Contagem do inóculo: 10 µL da diluição 10 ⁻⁴ da suspensão McF 0,5	10 UFC	1 – 10 ² / 1 – 100*

Notas:

* Colônias são separadas, mas às vezes é difícil contá-las devido à aglomeração.

** Crescimento confluyente (impossível de contar).

Tabela 4 Resultados das CMI's modais provisórias e faixas de CMI para a cepa de controle de qualidade (*M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294), definidas por testes interlaboratoriais (laboratórios EUCAST-AMST) com o método de referência de microdiluição em caldo da EUCAST.

Antimicrobianos	CMI modal de CQ (mg/L)	Faixa de CMI de CQ (mg/L) >95% dos testes
Amicacina	0,5	0,5 – 1
Bedaquilina	0,03	0,016 – 0,06
Clofazimina	0,5	0,25 – 1
Delamanida	0,004	0,002 – 0,008
Isoniazida	0,03	0,016 – 0,06
Levofloxacino	0,25	0,25 – 0,5
Pretomanida	0,12	0,06 – 0,12

Figura 1A Esquema do conjunto de placa de microtitulação para determinação da CMI de antimicrobianos solúveis em água: exemplo para testar três cepas (S1, S2, S3) e dois antimicrobianos cada, ou um antimicrobiano em duplicata.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	200 µL H ₂ O dest.	200 µL H ₂ O dest.	200 µL H ₂ O dest.	200 µL H ₂ O dest.	200 µL H ₂ O dest.	200 µL H ₂ O dest.	200 µL H ₂ O dest.	200 µL H ₂ O dest.	200 µL H ₂ O dest.	200 µL H ₂ O dest.	200 µL H ₂ O dest.	200 µL H ₂ O dest.
B	Controle negativo	GC100% S1	ATTB C8	ATTB C7	ATTB C6	ATTB C5	ATTB C4	ATTB C3	ATTB C2	ATTB C1	GC100% S1	200 µL H ₂ O dest.
C	Controle negativo	GC1% S1	ATTB C8	ATTB C7	ATTB C6	ATTB C5	ATTB C4	ATTB C3	ATTB C2	ATTB C1	GC1% S1	200 µL H ₂ O dest.
D	Controle negativo	GC100% S2	ATTB C8	ATTB C7	ATTB C6	ATTB C5	ATTB C4	ATTB C3	ATTB C2	ATTB C1	GC100% S2	200 µL H ₂ O dest.
E	Controle negativo	GC1% S2	ATTB C8	ATTB C7	ATTB C6	ATTB C5	ATTB C4	ATTB C3	ATTB C2	ATTB C1	GC1% S2	200 µL H ₂ O dest.
F	Controle negativo	GC100% S3	ATTB C8	ATTB C7	ATTB C6	ATTB C5	ATTB C4	ATTB C3	ATTB C2	ATTB C1	GC100% S3	200 µL H ₂ O dest.
G	Controle negativo	GC1% S3	ATTB C8	ATTB C7	ATTB C6	ATTB C5	ATTB C4	ATTB C3	ATTB C2	ATTB C1	GC1% S3	200 µL H ₂ O dest.
H	200 µL H ₂ O dest.	200 µL H ₂ O dest.	200 µL H ₂ O dest.	200 µL H ₂ O dest.	200 µL H ₂ O dest.	200 µL H ₂ O dest.	200 µL H ₂ O dest.	200 µL H ₂ O dest.	200 µL H ₂ O dest.	200 µL H ₂ O dest.	200 µL H ₂ O dest.	200 µL H ₂ O dest.

Legenda:

H₂O dest.: água destilada estéril.

Controle negativo: 200 µL de 7H9-OADC.

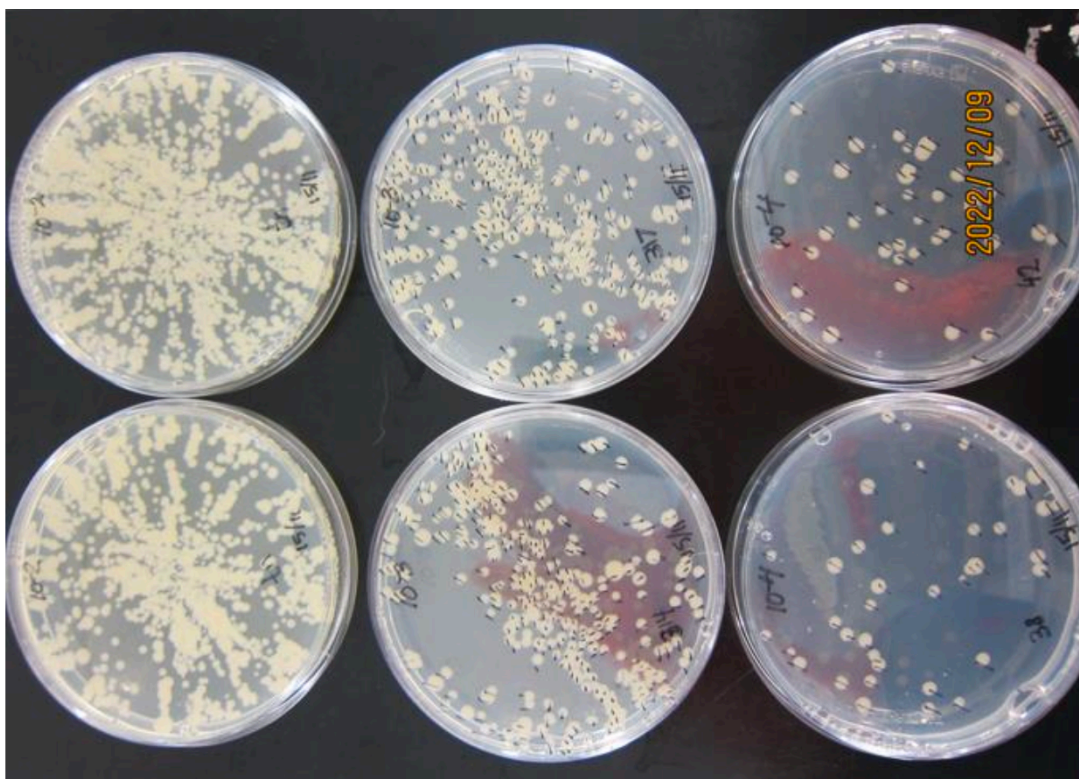
CC100%: 100 µL de 7H9-OADC + 100 µL de suspensão de inóculo 10⁻².

CC1%: 100 µL de 7H9-OADC + 100 µL de suspensão de inóculo 10⁻⁴.

S1–S3: cepas 1 a 3.

C1–C8: concentrações de antimicrobiano 1 a 8.

Figura 2. Fotografias dos inóculos observados após a semeadura de acordo com o protocolo detalhado. Da esquerda para a direita: resultados após a semeadura de 10 µL da diluição 10^{-2} (cerca de 1000 colônias, crescimento confluyente ou colônias não separadas); 10 µL da diluição 10^{-3} (cerca de 50–500 colônias, colônias separadas, mas não passíveis de contagem); 10 µL da diluição 10^{-4} (colônias separadas e passíveis de contagem).





EUCAST EUROPEAN COMMITTEE
ON ANTIMICROBIAL
SUSCEPTIBILITY TESTING
European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

Antimicrobianos em **Subcomitê de Testes de Suscetibilidade a**
Micobactérias **(AMST)***

* Lista de membros disponível em: <https://www.eucast.org/ast-of-mycobacteria/organisation-of-amst>