



## Metodologia de disco-difusão BrCAST-EUCAST para bactérias anaeróbias selecionadas de crescimento rápido\* em ágar anaeróbio fastidioso com sangue de cavalo desfibrinado (*Fastidious Anaerobe Agar with defibrinated horse blood - FAA-HB*)

\*Este método é validado para incubação de 16-20 h para *Bacteroides spp.*, *Prevotella spp.*, *Fusobacterium necrophorum*, *Clostridium perfringens* e *Cutibacterium acnes*. Não pode ser usado para outras espécies de bactérias anaeróbias ou incubar além de 20 h.

### Alterações em relação à versão anterior (1.0)

Seção	Alterações
<b>Geral</b>	A abreviação do meio mudou de FAA para FAA-HB
<b>Meio, 1c</b>	A vida útil esperada para ágar FAA-HB produzido no laboratório mudou de 14 para 21 dias
<b>Inoculação, 1a</b> <b>Solução de problemas, 1b</b>	Nova recomendação para remover o excesso de inóculo do <i>swab</i> antes de inocular as placas com <i>Clostridium perfringens</i>
<b>Inoculação, 2a</b> <b>Solução de problemas, 1b</b>	Foram acrescentadas informações de que é particularmente importante inocular as placas corretamente também para algumas espécies de <i>Prevotella</i> , que apresentam crescimento de colônias pequenas em FAA-HB
<b>Solução de problemas, 1a</b>	Foram adicionadas informações sobre a composição das placas comerciais de meio FAA-HB
<b>Solução de problemas, 1c</b>	Informações adicionais sobre o número de discos que devem ser colocados por placa
<b>Tabelas de CQ</b>	Os critérios de controle de qualidade para as cepas de CQ anaeróbias passaram deste documento para as tabelas do documento de Controle de Qualidade (CQ) do BrCAST-EUCAST

## Meios

1. Utilizar Ágar Anaeróbio Fastidioso com 5% de sangue de cavalo mecanicamente desfibrinado (FAA-HB) e nenhum outro aditivo.
  - a. A profundidade do ágar deve ser de  $4,0 \pm 0,5$  mm.
  - b. Para a preparação das placas no laboratório, deixar o meio esfriar entre 42-45°C antes de adicionar o sangue.
  - c. As placas produzidas no laboratório devem ser armazenadas a 4-8°C e protegidas da luz. O prazo de validade deve ser determinado como parte do programa de garantia da qualidade laboratorial, mas pode-se esperar um prazo de validade mínimo de 21 dias.
  - d. As placas preparadas comercialmente devem ser armazenadas conforme recomendado pelo fabricante, protegidas da luz e utilizadas dentro do prazo de validade.
  - e. As placas FAA-HB devem estar com a superfície seca antes da inoculação para evitar o excesso de umidade, que pode resultar em bordas de halos mal definidas, véu (*swarming*) e/ou névoa dentro do halo de inibição. Um dos seguintes procedimentos pode ser usado:
    - i. Secar a 20-25°C durante a noite ou
    - ii. Secar a 35°C, com a tampa removida, por 15 min. As placas devem atingir a temperatura ambiente antes desta etapa.
    - iii. Para placas armazenadas em sacos plásticos ou recipientes selados, pode ser necessário secar inicialmente as placas de acordo com o descrito acima nos itens (i) e (ii).
  - f. Não pré-reduzir as placas FAA-HB em um ambiente de anaerobiose antes do uso.

## Preparação do inóculo

1. Usar alça ou *swab* estéreis para suspender as colônias de uma cultura anaeróbia incubada por 16-24h em meios não seletivos. Usar várias colônias morfológicamente semelhantes (quando possível).
2. Suspender as colônias em solução fisiológico estéril 0,85% (salina) e homogeneizar até obter uma turbidez uniforme.
3. Ajustar a densidade da suspensão do inóculo para 1.0 (variável aceitável de 0,9-1.1) da escala de McFarland adicionando salina ou mais bactérias. Recomenda-se o uso de um fotômetro.
4. Usar a suspensão do inóculo **dentro de 15 minutos** após o preparo.

## Inoculação de placas de ágar

1. Mergulhar um *swab* estéril na suspensão 1.0 de McFarland.
  - a. Para *Bacteroides* spp. e *Clostridium perfringens*, remover o excesso do inóculo girando o *swab* contra a parede interna do tubo, acima do nível da suspensão para evitar o excesso de inóculo.

2. Espalhar o inóculo uniformemente por toda a superfície do ágar, garantindo que não haja lacunas entre as estrias.
  - a. Esta recomendação é particularmente importante para espécies que apresentam crescimento de colônias pequenas em FAA-HB, como *Cutibacterium acnes* e algumas *Prevotella* spp. Uma placa de ágar corretamente inoculada resultará em um crescimento confluyente com halos de inibição uniformemente circulares.

### Aplicação de discos antimicrobianos

1. Utilizar as potências dos discos recomendadas pelo BrCAST-EUCAST, conforme listado nas [Tabelas de Pontos de Corte](#) ou [Tabelas de Controle de Qualidade](#) do BrCAST-EUCAST.
2. Os discos devem estar à temperatura ambiente antes da abertura dos cartuchos ou recipientes utilizados para o armazenamento dos discos.
3. Aplicar os discos **dentro de 15 minutos** após a inoculação das placas.
  - a. Os discos devem estar em contato com a superfície do ágar por completo e não devem ser movidos depois de aplicados.
  - b. Para evitar a sobreposição de halos de inibição, o número de discos em uma placa deve ser limitado. Idealmente, usar no máximo três discos em uma placa circular de 90 mm (quatro discos podem ser usados para *Bacteroides* spp.).

### Incubação de placas

1. Inverter as placas e certificar-se de que os discos não se desprendam da superfície do ágar. Incubar **dentro de 15 minutos** após a aplicação dos discos.
2. Incubar placas de FAA-HB em ambiente de anaerobiose a 35-37°C por 16-20 h.
  - a. O ambiente de anaerobiose pode ser obtido utilizando jarras ou recipientes com geradores de anaerobiose ou em um sistema gerador de gás.
  - b. A incubação prolongada (além de 20 h) não é permitida, pois afetará o tamanho dos halos de inibição e invalidará os critérios de interpretação.

### Leitura dos halos de inibição

1. Um inóculo correto deve resultar em um crescimento confluyente e uniformemente distribuído sobre a superfície do ágar FAA-HB. Se o crescimento não for confluyente, o teste deve ser repetido ou como alternativa, utilizar um método para a determinação da CIM.
2. Ler as placas de frente com a tampa removida e com luz refletida.
3. Ler as bordas dos halos no ponto de completa inibição do crescimento, visto a olho nu, com a placa posicionada a cerca de 30 cm dos olhos em um ângulo de 45 graus em relação à bancada de trabalho.

4. Medir os diâmetros dos halos de inibição em milímetros com régua ou paquímetro.
  - a. Se ocorrer crescimento de colônias dentro do halo de inibição, ler a borda mais nítida do halo. Inclinando a placa em sua direção para definir melhor a borda mais nítida do halo.
  - b. No caso de duplos halos, ler a borda interna do halo.
  - c. Ignorar a hemólise e o véu (*swarming*) ao ler os halos.
5. Colônias isoladas dentro do halo de inibição devem ser levadas em consideração. **Para clindamicina, é particularmente importante examinar cuidadosamente os halos de inibição para verificar se há crescimento de colônias dentro do halo.**
6. Figuras com exemplos de leitura estão disponíveis no [Guia de Leitura pelo método de difusão-disco de bactérias anaeróbias no FAA-HB](#).

### Controle de qualidade

1. Realizar o CQ a cada realização do teste. Usar cultura bacteriana incubada por 16-24h da cepa de CQ e seguir o mesmo procedimento do teste para os isolados clínicos.
  - a. Usar *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 e *Clostridium perfringens* ATCC 13124 para monitorar o desempenho do teste. Para alvos e intervalos de CQ, consultar [Tabelas de CQ do BrCAST-EUCAST](#).
  - b. Usar *Clostridium perfringens* DSM 25589 (NCTC14679) com um disco de metronidazol de 5 µg para monitorar a atmosfera de anaerobiose. Esta combinação tem se mostrado um indicador sensível da atmosfera anaeróbia. A anaerobiose insuficiente pode afetar o crescimento e os resultados dos testes de sensibilidade para bactérias anaeróbias. Para critérios interpretativos, ver [Tabelas de CQ do BrCAST-EUCAST](#).

### Solucionando problemas

1. Pode haver uma ou várias razões para resultados de CQ fora do intervalo. A adesão rigorosa ao protocolo é necessária para garantir resultados confiáveis.

#### Orientação para solução de problemas:

- a. Meio de cultura
  - i. As placas FAA-HB são armazenadas e secas de acordo com as instruções acima?
  - ii. A profundidade do ágar é de  $4,0 \pm 0,5$  mm? A profundidade correta do ágar, 4,0 mm e  $\pm 0,5$  mm pode explicar desvios aleatórios, mas não sistemáticos.
  - iii. As placas comerciais FAA-HB são preparadas de acordo com as recomendações do BrCAST-EUCAST com 5% de sangue de cavalo mecanicamente desfibrinado como único suplemento?

- b. Inoculação das placas
  - i. Certificar-se de que o inóculo está espalhado uniformemente por toda a superfície do ágar, garantindo que não haja lacunas entre as estrias.
    - 1. Esta recomendação é particularmente importante para espécies com crescimento de colônias pequenas em FAA-HB como *Cutibacterium acnes* e algumas *Prevotella* spp.
  - ii. Para *Bacteroides* spp. e *Clostridium perfringens*, certifique-se de remover o excesso de inóculo girando o *swab* contra a parede interior do tubo para evitar a inoculação excessiva.
- c. Discos de antimicrobianos
  - i. Limitar o número de discos na superfície do ágar para permitir o crescimento e evitar a sobreposição de halos. Para a maioria das espécies e agentes antimicrobianos, três discos podem ser usados em uma placa circular de 90 mm, sendo que para alguns isolados podem ser utilizados apenas dois discos por placa.
  - ii. Permitir que os discos atinjam a temperatura ambiente antes de abrir os cartuchos ou recipientes que contém os discos e certificar-se de aderir às recomendações de armazenamento dos discos.
- d. Incubação
  - i. Verificar a atmosfera anaeróbia (independentemente de como é gerada) regularmente.
    - 1. A atmosfera de anaerobiose e a temperatura de incubação podem ser afetadas pela frequência com que o sistema é aberto para carga e retirada de placas, bem como pela quantidade de placas.
    - 2. Ao usar jarras ou recipientes para incubação anaeróbia, certifique-se de que não haja vazamento.
  - ii. Os pontos de corte do BrCAST-EUCAST e os critérios de CQ para o método de disco-difusão de bactérias anaeróbias em FAA-HB são validados apenas para incubação de 16-20 h.
    - 1. A incubação prolongada não é permitida, pois afetará significativamente os tamanhos dos halos.
- e. Leitura dos halos
  - i. Seguir as instruções de leitura específicas para anaeróbios, conforme listado acima. Figuras com exemplos estão disponíveis no [Guia de Leitura para o método de disco-difusão de bactérias anaeróbias no FAA-HB](#).