

AGAR MH-F (AGAR SANGUE DE CAVALO BASE MUELLER HINTON + B-NAD)

Teste de susceptibilidade a antimicrobianos para micro-organismos fastidiosos

NOME TÉCNICO

ÁGAR MUELLER HINTON SUPLEMENTADO COM SANGUE DE CAVALO DESFIBRINADO E B-NAD (MH-F)

APRESENTAÇÃO

Pacote com 10 placas 140x15mm – Cód. PA340
Pacote com 10 placas 90x15mm – Cód. PA341

COMPOSIÇÃO

Formulação	g/L
Extrato de carne	2,0
Peptona de caseína	17,5
Amido	1,5
Ágar bacteriológico	17,0
Sangue de cavalo desfibrinado	5-7%
β-NAD	20 mg/L
Água purificada	1.000 mL

A formulação pode ser ajustada e/ou suplementada, conforme necessário, para cumprir os critérios de desempenho.

REGISTRO NO MINISTÉRIO DA SAÚDE

10287910085

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

Conservar o produto sob refrigeração (2° a 8° C).

Válido por 120 dias após a fabricação.

Verificar o prazo de validade na embalagem.

Nunca utilizar produtos com validade expirada.

Este produto apresenta na sua composição elevada porcentagem de água, por isso ao sofrer variações de temperatura ele pode apresentar água de condensação em quantidades variadas, ocasionando o acúmulo de água na placa.

A água acumulada na placa por variação de temperatura não altera o desempenho do produto, desde que este não apresente ressecamento, contaminação, ou seja, alteração no aspecto do produto.

O uso de refrigerador frost-free não é recomendado para os meios de cultura devido ao efeito desidratante deste tipo de equipamento.

Recomenda-se guardar as placas com o meio de cultura virado para cima, e quando ocorrer o acúmulo de água, desprezar a água de condensação e deixar o meio de cultura estabilizar a temperatura ambiente antes de sua utilização. Retirar da refrigeração apenas a quantidade de produto a ser utilizado na rotina e deixar estabilizar a temperatura, ou secar a água condensada antes da sua utilização, em temperatura ambiente ou incubar em estufa $\pm 37^{\circ}\text{C}$. A repetição do processo de refrigeração/estabilização não é recomendada, pois a constante troca de temperatura, pode ocasionar a desidratação do meio, expor o produto a contaminação ou gerar acúmulo excessivo de água.

TRANSPORTE

O produto pode ser transportado em temperatura ambiente (10 a 30° C) por até 120 horas.

CUIDADOS ANTES DO USO

Não utilizar placas com gotículas de água na superfície. Caso existam gotículas de água secar a placa em estufa microbiológica antes do uso.

Por tratar-se de material estéril, manusear o produto utilizando equipamentos de proteção individual (luvas, avental e máscara) em ambiente com assepsia de preferência em cabine de segurança biológica classe II.

Não usar materiais com selo de qualidade rompido ou violado.

MATERIAIS E EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS E NÃO FORNECIDOS COM O PRODUTO

Alça bacteriológica, frascos estéreis e swabs para coleta das amostras; fluxo laminar, bico de bunsen; estufa bacteriológica; microscópio ótico; cloreto de sódio estéril; incubadores para crescimento de CO_2 e seleção de antibióticos.

INFORMAÇÕES TÉCNICAS**- FINALIDADE**

Meio de cultura enriquecido, utilizado para o teste de susceptibilidade a antimicrobianos pelo método de disco difusão para micro-organismos fastidiosos (exigentes), incluindo, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus* spp., *Moraxella catarrhalis*, *Campylobacter jejuni* e *coli*, estreptococos do grupo Viridans, estreptococos dos grupos A, B, C e G, *Listeria monocytogenes*, *Pasteurella multocida*, bem como *Corynebacterium* spp de acordo com os padrões estabelecidos pelo European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) e Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST). A sua composição garante uma interferência mínima dos componentes da fórmula no resultado do teste da susceptibilidade antimicrobiana, já que possui uma substancial fonte de proteínas e carboidratos que proporcionam o desenvolvimento e crescimento de cepas bacterianas de interesse clínico. Além disso, sua baixa concentração de timina e timidina e níveis adequados dos íons de cálcio e

magnésio (cátions ajustados) evitam falsos resultados de sensibilidade ou resistência.

- AMOSTRA

As amostras podem ser de qualquer natureza clínica desde que as colônias sejam isoladas e apresentem o mesmo tipo morfológico, e sejam de uma cultura de 18 a 24 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. As amostras devem ser colhidas seguindo cuidados específicos de forma a se obter representatividade do processo infeccioso, assepsia na coleta da amostra e sem interações medicamentosas.

- TÉCNICA DE USO**INOCULAÇÃO (método de suspensão direta de colônias recomendado pelo EUCAST/BrCAST)**

- Fazer uma suspensão de micro-organismos de modo a obter densidade equivalente ao padrão de turbidez 0,5 da escala de *McFarland*, que corresponde aproximadamente a $1-2 \times 10^8$ UFC/mL para *Escherichia coli*. O método da suspensão direta das colônias é apropriado para todos os micro-organismos, incluindo os fastidiosos;

- Preparar a suspensão a partir de um crescimento *overnight* (cultura de 20 a 24 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) proveniente de um meio não seletivo. Usar várias colônias morfológicamente similares (quando possível) para evitar selecionar variantes atípicas e suspender as colônias em Cloreto de Sódio 0,85% estéril (PA88) com alça estéril ou swab de algodão;

- Ajustar a suspensão do inóculo de modo a obter turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala de *McFarland* adicionando Cloreto de Sódio 0,85% estéril ou mais bacterias. Um inóculo mais denso pode resultar em halos menores e inóculo com menor densidade terá um efeito oposto. É recomendado que um dispositivo fotométrico seja utilizado para ajustar a densidade da suspensão. O fotômetro deve ser calibrado com o padrão 0,5 da escala de *McFarland*, de acordo com as instruções do fabricante. Alternativamente, a densidade da suspensão pode ser comparada visualmente com a turbidez do padrão 0,5 da escala de *McFarland*. Para auxiliar a comparação, comparar o teste e padrão contra um fundo branco com linhas pretas;

- As suspensões de *Streptococcus pneumoniae* devem ser preferencialmente preparadas a partir de cultura obtida de ágar sangue de modo a obter densidade equivalente ao padrão 0,5 da escala de *McFarland*. Quando a suspensão for preparada a partir de cultura em ágar chocolate, a turbidez do inóculo deve ser equivalente ao padrão 1.0 da escala de *McFarland*;

- A suspensão deve ser utilizada de preferência em até 15 min e obrigatoriamente até 60 min após a preparação (Parte da regra dos 15-15-15 minutos: use a suspensão do inóculo dentro de 15 minutos da preparação, aplique os discos dentro de 15 minutos da semeadura e incube as placas dentro de 15 minutos da aplicação dos discos);

- Garanta que as placas estejam em temperatura ambiente previamente à inoculação;

- Mergulhar um swab de algodão estéril na suspensão. Para evitar a inoculação excessiva das placas de microrganismos gram-negativos, remova o excesso de líquido pressionando e girando o swab contra a parte interna do tubo acima do nível da suspensão. Para bactérias gram-positivas, não pressione o swab contra a parte interna do tubo. Quando inocular várias placas com a mesma suspensão do inóculo, repita o procedimento para cada placa de ágar;

- As placas podem ser inoculadas tanto espalhando o inóculo uniformemente em três direções como por um inoculador automatizado. Espalhar o inóculo uniformemente sobre toda a superfície assegurando que não haja falhas. Para bactérias gram-positivas, tenha atenção especial a fim de garantir que não exista diferença na semeadura;

- Aplicar os discos de antibióticos (previamente validados) em até 15 min após a inoculação da placa. Se as placas inoculadas forem deixadas em temperatura ambiente por períodos prolongados de tempo antes da aplicação dos discos, os microrganismos podem começar a crescer, resultando em redução errônea do tamanho dos halos de inibição;

- Permitir que os discos alcancem a temperatura ambiente antes da abertura dos cartuchos ou recipientes utilizados para o armazenamento dos discos. Isto previne a condensação, que leva a rápida deterioração de alguns agentes;

- Aplicar os discos firmemente na superfície da placa de ágar dentro de 15 minutos da inoculação. O contato dos discos com a superfície do ágar deve ser completo. Os discos não podem ser removidos após a aplicação nas placas, uma vez que a difusão dos agentes antimicrobianos dos discos é muito rápida;

- O número de discos nas placas deve ser limitado para impedir sobreposição dos halos e a interferência entre os antimicrobianos. É importante que os diâmetros dos halos sejam medidos corretamente. O número máximo de discos varia de acordo com o microrganismo e a seleção dos discos. Normalmente, 6 e 12 discos são os números máximos possíveis, respectivamente, em placas circulares de 90 e 140 mm;

- Para detecção da resistência induzível à clindamicina em estafilococos e estreptococos, os discos de eritromicina e clindamicina devem ser posicionados em uma distância de 12 a 20 mm borda a borda para os estafilococos e 12 a 16 mm para estreptococos. A perda de potência dos agentes antimicrobianos contidos nos discos resulta na redução dos diâmetros dos halos e é uma fonte comum de erro. Os cuidados listados a seguir são essenciais:

1. Armazenar os discos, incluindo os que estão em dispensadores, em embalagens fechadas com dessecador (sílica gel) e protegidos da luz (alguns agentes como rifampicina, tigeciclina, metronidazol, cloranfenicol e fluorquinolonas, são inativados por exposição prolongada à luz). Especial atenção a refrigeradores, freezer com porta de vidro e iluminação interna;

2. Armazenar os discos em estoque de acordo com as instruções do fabricante. Alguns agentes são mais sensíveis que outros (como por exemplo, amoxicilina-ácido clavulânico, cefaclor e carbapenems) e existem recomendações específicas dos fabricantes;

3. Armazenar os discos em uso de acordo com as instruções do fabricante. Uma vez os recipientes abertos, os discos devem ser utilizados dentro da data de validade estabelecida pelo fabricante. Descartar os discos na data de expiração indicada na embalagem;

4. Realizar frequentemente o controle de qualidade dos insumos em uso para garantir que os discos antimicrobianos não perderam a potência durante o armazenamento.

INCUBAÇÃO

- Inverter as placas e assegurar que os discos não caiam na superfície do ágar. Incubar em até 15 minutos após a aplicação dos discos. Se as placas forem deixadas em temperatura ambiente após a aplicação dos discos, a pré difusão pode resultar em halos de inibição erroneamente aumentados;

- O empilhamento das placas na estufa pode alterar os resultados devido ao aquecimento desigual entre elas. A eficiência das estufas varia e dessa forma o controle de incubação, incluindo o número apropriado de placas empilhadas deve fazer parte do programa de garantia de qualidade do laboratório;

- Incubar as placas de acordo com as condições indicadas (as placas que contêm sangue devem ser incubadas sob tensão de CO₂ (4-6%) em estufa bacteriológica entre 34 e 36° C por 16 a 20 horas) em <http://brcast.org.br/documentos/>;

- Incubação além do limite de tempo recomendado não é permitido uma vez que resulta no crescimento dentro do halo de inibição e reporte de isolados falso resistentes. Para testes de sensibilidade dos glicopeptídeos com algumas cepas de *Enterococcus* spp. colônias resistentes não são visíveis até que as placas tenham sido incubadas por 24 horas completas. Mesmo assim, as placas podem ser examinadas depois de 16 a 20 horas e qualquer resistência reportada, mas placas de isolados aparentemente sensíveis devem ser reincubadas e novamente lidas com 24 horas;

- Atentar que há diferenças na turbidez, atmosfera e tempo de incubação para alguns micro-organismos específicos. Consultar tabela completa em <http://brcast.org.br/documentos/>;

LEITURA E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

- Medir o diâmetro dos halos na zona de inibição com régua apropriada, a utilização de paquímetro também é recomendada;

- A aferição e interpretação dos diâmetros dos halos de inibição apresentam variação entre algumas espécies bacterianas. Consultar o documento: Método de disco-difusão disponível em <http://brcast.org.br/documentos/> para obter estas informações detalhadas sobre as diferentes espécies avaliadas;

- Comparar os diâmetros dos halos obtidos com Tabela de Pontos de Corte Clínicos disponibilizadas pelo EUCAST/BrCAST.

ESPÉCIE	RESULTADO ESPERADO
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 49619	Consultar a tabela de Controle de Qualidade EUCAST/BrCAST disponível em http://brcast.org.br
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC® 49766	
<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC® 33560	

DESEMPENHO DO PRODUTO

- ESPECIFICIDADE

Enterobacterales
Pseudomonas spp.
Stenotrophomonas maltophilia
Acinetobacter spp.
Staphylococcus spp.
Enterococcus spp.
Streptococcus grupos A, B, C e G
Streptococcus pneumoniae
Streptococcus grupo viridans
Haemophilus influenzae
Moraxella catarrhalis
Listeria monocytogenes
Pasteurella multocida
Campylobacter jejuni e *coli*
Corynebacterium spp.
Aerococcus sanguinicola e *urinae*
Kingella kingae

- LIMITE DE DETECÇÃO

100 UFC/mL

DESCARTE DO PRODUTO E DA AMOSTRA

Descartar o produto e a amostra de acordo com o programa de gerenciamento de resíduos do laboratório e legislações vigentes.

* Para o produto sem contato com a amostra seguir o plano de gerenciamento de resíduos químicos.

* Para a amostra e produto com amostra seguir plano de gerenciamento de resíduos infectantes ou possivelmente infectantes.

* Após incubação o produto deverá ser autoclavado a 121° C por 30 minutos e descartado em lixo apropriado.

CONTROLE DE QUALIDADE

ANÁLISES	RESULTADO ESPERADO
pH final	7,3 ± 0,1
Aspecto final	Meio vermelho sangue opalescente
Espessura	4,0 ± 0,5 mm no centro da placa
Desempenho microbiológico <i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	Crescimento bom de colônias α-hemolíticas
Eritromicina (ERI-5)	26 a 32 mm

Oxacilina (OXI-1)	8 a 14 mm
Norfloxacina (NOR-10)	18 a 24 mm
Meropenem (MER-10)	30 a 38 mm
Trimetropim-Sulfametoxazol (SUT-25)	18 a 26 mm
Desempenho microbiológico <i>H. influenzae</i> ATCC 49766	Crescimento bom de colônias γ-hemolíticas
Ampicilina (AMP-2)	19 a 25 mm
Cefuroxima (CXM-30)	26 a 34 mm
Cloranfenicol (CLO-30)	31 a 37 mm
Trimetropim-Sulfametoxazol (SUT-25)	27 a 35 mm
Esterilidade	Ausência de crescimento

GARANTIA DA QUALIDADE

Este produto é fabricado e liberado para venda após testes de controle de qualidade para cada lote, conforme normas das Boas Práticas de Fabricação e Controle de produtos para diagnóstico de uso *in vitro*.

Para eficácia do produto é necessário:

- Utilizar amostras clínicas coletadas, transportadas e armazenadas de acordo com a indicação da literatura especializada;

- Seguir rigorosamente todas as etapas descritas nesta instrução de uso.

- Utilizar acessórios e equipamentos adequados e em boa conservação.

- Transportar e armazenar o produto de acordo com as condições indicadas.

- Nunca utilizar produtos com a embalagem original danificada.

- Nunca utilizar produto com prazo de validade expirado.

Caso ocorra qualquer problema na utilização do produto relativo à qualidade intrínseca do mesmo, que tenha ocorrido por falha de fabricação comprovada, a Newprov resolverá a questão sem ônus ao cliente, conforme determinado na Lei 8.078/90 – Código de Defesa do Consumidor.

A Newprov disponibiliza aos seus clientes assessoria técnico-científica para quaisquer esclarecimentos necessários quanto a utilização deste produto que não estejam contemplados nesta instrução de uso, através de contato com o SAC - Serviço de Atendimento ao Consumidor.

Certificados de análise de cada lote estão disponíveis na empresa e podem ser encaminhados ao cliente sempre que solicitados ao SAC ou acesso pelo site www.newprov.com.br após cadastro no campo de acesso restrito.

A versão atual da instrução de uso encontra-se disponível no site www.newprov.com.br. Na necessidade da versão impressa, solicitar sem custo adicional (inclusive de envio) ao nosso SAC pelo (41) 38881300 ou sac@newprov.com.br.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DWorkin M et. al 2006. *The Prokaryotes (a Handbook on the Biology of Bacteria)* 3rd ed, Vol. 2.

MURRAY, P. R. et al. (Eds) *Manual of Clinical Microbiology*. 9th Ed. Washington D.C.: ASM, 2007.

PILONETTO, M.; PILONETTO, D. V. *Manual de procedimentos laboratoriais em Microbiologia – POPs em Microbiologia*. Curitiba: Microscience, 1998.

WINN Jr., W. et al (Eds.) *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6th Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

BrCAST - Método de Disco-Difusão para Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos Versão 6.0 (Janeiro de 2017)

Matuschek, E., Brown, D.F. and Kahlmeter, G. *Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories*. Clin Microbiol Infect. 2014; 20(4): 255-66.

EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing. Consulte a versão mais recente em <http://www.eucast.org>.

Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., and Turck, M. *Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method*. Am. J. Clin. Pathol. 1966: 45:493-496.

The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters*. Version 6.0, 2016. <http://www.eucast.org>.

Koch, A.E. and Burchall, J.J. *Reversal of the antimicrobial activity of trimethoprim by thymidine in commercially prepared media*. Appl. Microbiol. 1971; 22:812-817.

The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST*. Version 6.0, 2016. <http://www.eucast.org>.

Baker, C.N., Thornsberry, C. and Hawkinson R.W. *Inoculum standardization in antimicrobial susceptibility testing: evaluation of overnight agar cultures and the rapid inoculum standardization system*. J. Clin. Microbiol. 1983: 17:450-457.

The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Reading guide. EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing*. Consulte a versão mais recente em <http://www.eucast.org>.

Washington, J.A., and Woods G.L. 1995. *Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods*. p. 1327-1341. In Murray, P.R., Baron, E.J., Tenover, M.A., Tenover, F.C., and Tenover, R.H. (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1995.

Neumann, M.A., Sahm, D.F., Thornsberry, C., McGowan, J.E., Jr. Cumitech 6A. *New developments in antimicrobial agent susceptibility testing: a practical guide*. Coordinating ed., J.E. McGowan, Jr. American Society of Microbiology, Washington, D.C. 1991.

PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO DE USO IN VITRO

Fabricado e distribuído por:
 Newprov Produtos para Laboratório Ltda

Rua 1º de Maio, 590/608 - Centro - CEP: 83323-020 - Pinhais - PR
CNPJ: 73.636.391/0001-09
Responsável Técnica:
Bárbara Pereira Albini – CRF/PR 19057
Indústria Brasileira
Serviço de Assessoria e Soluções de excelência em análises laboratoriais
SAC: 41 38881300 – sac@newprov.com.br