

Finalidade

Ágar Mueller Hinton Mbiolog é um meio de cultura, recomendado para a realização de antibiograma (teste de sensibilidade) pela técnica de difusão de discos segundo o CLSI para *Streptococcus spp.*

Princípio da Ação

Possui uma substancial fonte de proteínas e carboidratos que proporcionam o desenvolvimento e crescimento de cepas bacterianas de interesse clínico. Além disso, a baixa concentração de timina e timidina e níveis adequados de Cálcio e Magnésio, evitam falsos resultados de sensibilidade ou resistência.

Composição

Peptona de caseína	17,5 g/L
Peptona de carne	2,0 g/L
Amido	1,5 g/L
Ágar	17,0 g/L
Sangue de Carneiro	5%
Água destilada	q.s.p.
pH final	7,3 ± 0,1 a 25°C

Materiais necessários não fornecidos

- Bico de Bunsen ou câmara de fluxo laminar;
- Estufa bacteriológica;
- Alças de platina ou descartáveis.
- Swab estéril descartável

Armazenamento e transporte

A data de validade está descrita no rótulo da embalagem. Não usar produtos cuja data de validade tenha expirado.

Meio de cultura pronto para uso em placa de petri:

O meio de cultura deve ser mantido sob refrigeração, entre 2 a 8°C, bem selado, de forma a se evitar a oxidação do produto. Quando obedecidas essas condições de armazenamento, o meio de cultura em tubo se mantém adequado para uso até a data de validade expressa no rótulo.

Precauções e cuidados especiais

Somente para uso diagnóstico "in vitro". Usar luvas descartáveis quando manusear amostras. Não comer, beber, fumar, armazenar ou preparar alimentos, ou aplicar cosméticos dentro da área de trabalho onde reagentes e amostras estiverem sendo manuseados. A manipulação dos tubos só deve ser realizada próxima à chama ou

dentro de cabine com fluxo laminar, de forma a se evitar a contaminação do meio de cultura, evidenciada pelo crescimento espúrio de microrganismos. Verificar, antes de realizar o inóculo da amostra, o aspecto e as características do meio de cultura. Este deve se apresentar límpido, homogêneo, e com volume conforme sua apresentação. A constatação de qualquer irregularidade demonstra a inadequação do meio de cultura para uso. De igual importância, a verificação do meio, no que se refere à presença de contaminação. A constatação de crescimento de microrganismos, evidenciada pela turbidez do meio, acarreta no descarte do material, por este ser impróprio para uso. Todas as placas, bem como todo o material utilizado no processo de análise, devem, obrigatoriamente ser autoclavados a 121°C, a uma pressão de 1 ATM, durante 15 a 20 minutos, antes de seu descarte final.

Amostra

Por se tratar de meio de cultura adequado à realização de antibiogramas *Pour Plate*, recomenda-se utilizar colônias puras para inóculo. Este inóculo deve seguir à regra, as instruções de uso do produto.

Procedimento

Teste de sensibilidade

A metodologia proposta por Kirby-Bauer é recomendada mundialmente para a determinação da sensibilidade a antibacterianos, através da difusão em ágar; a OMS recomenda a utilização de Ágar Mueller Hinton como meio seletivo para a realização de provas de sensibilidade.

Preparo do inóculo

Em um tubo de ensaio estéril, dispensar 5 ml de **caldo soja tripticaseína (TSB)**, e repicar, neste meio, 4 a 5 colônias **puras** da bactéria a ser testada. Incubar durante 2-6 horas à temperatura ideal para crescimento da bactéria (usualmente entre 35 e 37°C). Não utilizar culturas mistas em provas de difusão, pois os resultados obtidos tendem a ser errôneos. Períodos de incubação elevados para o inóculo podem fornecer menores halos de inibição do que os usualmente obtidos. Em contrapartida, inóculos de baixa densidade bacteriana promovem halos de inibição maiores do que os normalmente verificados. Poderá também ser usada uma solução fisiológica estéril e nela introduzir colônias até que seja atingida uma turbidez de 0,5 na escala de Mc Farland.

Acerto da Turbidez

Preparar, em um tubo de ensaio igual ao utilizado na realização do inóculo, uma solução de sulfato de bário, a ser usada como referência de turbidez, da seguinte forma: 0,5 ml de cloreto do bário. 2H₂O 0,048 M + 99,5 ml de ácido sulfúrico 0,36 N (0,5 na escala de Mc Farland) Ajustar a turvação do meio inoculado em relação à solução de referência (pode-se utilizar solução salina fisiológica ou o próprio meio para este ajuste). Após o acerto da turvação, a concentração bacteriana no meio encontra-se entre 1 a 2 × 10⁸ bactérias/ml.

Semeadura

A semeadura do inóculo pode ser realizada com swab ou por superposição da camada de inóculo. Embeber a extremidade do swab no inóculo aferido e então pressioná-la na parede do tubo, de forma a remover o excesso de inóculo. Delicadamente, aplicar o inóculo sobre a superfície da placa de Ágar Mueller Hinton, em várias direções, de forma a cobrir toda a placa. Aguardar 15 minutos, para total secagem do inóculo aplicado.

Aplicação dos discos

Aplicar os discos com auxílio de um dispensador ou manualmente. Quando manualmente, aplicar os discos sobre a superfície da placa inoculada utilizando uma pinça flambada e fria. Após aplicar o disco sobre a placa, fazer leve pressão sobre o mesmo, de forma a melhorar a sua aderência ao meio. Deve-se permitir que a distância entre os discos seja suficiente para se evitar a sobreposição dos halos de inibição. Incubar a placa em posição invertida, durante 16-18 horas, entre 35 e 37°C. Quando necessária anaerobiose ou atmosfera de CO₂ deve-se padronizar a incubação.

Interpretação

Os halos de inibição devem ser qualificados com o auxílio de um paquímetro ou régua milimetrada. A expressão dos tipos de halos são: sensível, intermediário e resistente. Os fabricantes de discos de sensibilidade fornecem tabelas de halos de sensibilidade específicas para os discos empregados, os quais são baseados em informações do CLSI (documento M100) . Colônias, diferentes da colônia da cepa testada, que crescem no interior de halos são sugestivas de impureza no inóculo empregado ou de linhagens diferentes da mesma espécie. Determinados antibacterianos promovem a formação de halos duplos; estes casos, deve-se considerar apenas o halo interno, mais claro, e ignorar o halo mais externo e denso.

Controle de qualidade

O laboratório deve preferivelmente participar de programas de controle externo de qualidade, a exemplo daqueles oferecidos pela SBAC e SBPC. Para controle interno de qualidade, recomendamos utilizar as seguinte cepa: *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305.

Dados estatísticos

Por se tratar de meio de cultura de enriquecimento (seletivo), não existem formas de se realizar estudos de sensibilidade e especificidade.

Reprodutibilidade e repetitividade:

A realização de 20 culturas de uma mesma suspensão de cepa-padrão com valor 1,0 McF, em dias alternados, ao longo de 4 dias, demonstrou um coeficiente de variação igual a 8,03%.

Estabilidade:

Quando mantido sob condições ideais de armazenamento, o meio de cultura pronto para uso em placa mantém-se adequado para uso por 3

meses. O meio de cultura desidratado em frascos, quando mantido sob condições ideais de armazenamento, mantém-se adequado para uso até a data de vencimento impressa em seu rótulo.

Interferentes

Inóculos que contenham colônias mistas provocam resultados imprevisíveis; é recomendável refazer o isolamento da colônia bacteriana antes da repetição do teste.

Apresentação

Embalagens com 10 placas.

Bibliografia

1. Balows A., Hausler, W.J. Jr., Herrmann, K.L., Isenberg, H.D. and Shadomy, H.J. Manual of clinical microbiology. 5th Ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1991.
2. CSLI, M100S18, 2008.
3. CLSI, M2A9, 2006.
4. Difco & BBL Manual. Manual Of Microbiological Culture Media. Ed., United States of America, 2003.
5. Koneman, E.W. Trad. Cury, A.E. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 5a. Ed., MEDSI, Rio de Janeiro, 2001.
6. Murray, P.R., Baron, J.E., Tenover, C.F. and Tenover, C.F. and Tenover, H.R. Manual of clinical microbiology. American Society for Microbiology, 7th ed., Washington, DC, 1999.
7. MUELLER and HINTON.: Soc. Exp. Biol. and Med., 48: 330, 1941.
8. Oplustil, C.P., Zoccoli, C.M., Tobouti, N.R., e Sinto, S.I. Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica, Sarvier, São Paulo, 2000.



Rua Gama, 337 – Vila Paris
Contagem / MG – CEP: 32372-120
CNPJ: 03.590.360/0001-89
Tel.: (31) 3507.0707
Fax: (31) 3507.0700
mbiolog@mbiolog.com.br
www.mbiolog.com.br

Farm. Resp.: Fabrício Galvão de Brito
CRF-MG: 9587