

Finalidade:

Meio de cultura destinado à realização do teste de sensibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco-difusão para *Haemophilus* spp. segundo descrito pela Norma Aprovada M2-CLSI, publicada pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Registro ANVISA:

10097010-114

LB 172258
Rev. 03 – 06/2024

Apresentação:

540212 – HTM AGAR-25mL-PL90X15-10PL

1. INTRODUÇÃO

Em 1966, Bauer, Kirby e outros desenvolveram um padrão para o teste de susceptibilidade antimicrobiana de bactérias comuns em que o agar Mueller Hinton foi selecionado como meio de teste. Porém o agar Mueller Hinton não é satisfatório para microrganismos fastidiosos como alguns estreptococos, gonococos e espécies de *Haemophilus*.

Membros do gênero *Haemophilus* são microrganismos fastidiosos que exigem a adição dos fatores de crescimento hemina (Factor X) e / ou dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD ou Fator V).

O Meio de Teste para *Haemophilus* (HTM), consiste em ágar de Mueller Hinton suplementado com factor X (hemina ou hematina), fator V (dinucleótido de nicotinamida adenina, NAD) e extrato de leveduras.

Contém níveis baixos de timidina sendo, por isso, adequado para testes com trimetoprim/sulfametoxazol.

Sua grande vantagem, a possibilidade de medições do diâmetro da zona a partir do fundo da placa, devido a transparência do meio, quando comparado com o Ágar de chocolate de Mueller Hinton, como o exigido em procedimento de teste padrão para microrganismos não exigentes em Ágar de Mueller Hinton.

Os critérios de interpretação do teste de sensibilidade aos antimicrobianos são fornecidos na norma M100, incluída no CLSI.

2. COMPOSIÇÃO

Formulação	Concentração/ L
Extrato de Carne	2,0g
Hidrolisado de Caseína	17,5
Amido	1,5g
Agar	17,0g
Extrato de Levedura	5,0g
Hematina	0,015g
Dinucleótido de adenina nicotinamida (NAD)	0,015g
pH 7,3 ± 0,1 a 25°C	

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

3. AMOSTRA

a- Tipos de amostras

Culturas recentes de bactérias, preferencialmente *over-night*, isoladas de agar chocolate. Caso não seja possível a execução da prova após 20 a 24 horas de incubação, realizar novo repique das colônias. Descartar culturas que se apresentem contaminadas ou nas quais existam diversas espécies cultivadas que não possam ser separadas visualmente.

4. INFORMAÇÕES GERAIS SOBRE O PRODUTO

a- Princípio

Placas contendo ágar HTM, formulado agar mueller Hinton suplementado com factor X, fator V e extrato de leveduras.

b- Armazenamento e estabilidade

Para fins de transporte, o produto pode permanecer em temperatura ambiente por até 72h. No laboratório as placas devem ser

armazenadas em temperatura de 2 a 8°C, condições em que se mantém estáveis até a data de vencimento expressa em rótulo, desde que isento de contaminação de qualquer natureza. O uso de refrigerador tipo *frost-free* não é recomendado para meios de cultura devido ao efeito desidratante deste tipo de equipamento.

Considerando que este produto é gelatinoso e sua composição pode apresentar até 80% de água, ao sofrer variações de temperatura (quente-frio ou frio-quente) todo meio de cultura pode gerar condensação, de pouca a muita, acumulando água na placa. Recomenda-se guardar as placas com os meios de cultura virados para cima e, quando necessário, desprezar a água acumulada e deixar o meio de cultura estabilizar a temperatura antes de sua utilização.

Conforme descrito em literatura, o laboratório deve retirar da refrigeração apenas a quantidade de produto que deverá ser utilizada em sua rotina e deixar estabilizar a temperatura, ou secar a água condensada, antes de sua utilização, em temperatura ambiente, podendo utilizar a incubação em estufa ($\pm 37^\circ\text{C}$) para redução do tempo de secagem ou estabilização. A repetição do processo de refrigeração/estabilização não é recomendada, a constante troca de temperatura pode levar a desidratação do meio, expor o produto a contaminações ou gerar um acúmulo de água excessivo.

A água acumulada por condensação, ocasionada por alguma variação de temperatura, não influencia no desempenho do produto, desde que este não apresente ressecamento ou diminuição de espessura.

Devido à presença de suplementos químicos sensíveis, recomenda-se manter o produto protegido de incidência direta de luz (natural ou artificial) e evitar grandes variações de temperatura até a utilização.

c- Precauções e cuidados especiais

- O produto destinado apenas para o uso diagnóstico *in vitro*;
- Uso restrito por profissionais;
- Mesmo se tratando de produto livre de agentes infecciosos, recomenda-se tratar este produto como potencialmente infeccioso, observando o uso de equipamentos de proteção individual e coletivo;
- Não inalar ou ingerir;
- Não utilizar placas com sinais de contaminação, ressecamento ou com alterações de cor ou espessura;
- Não usar materiais com o prazo de validade expirado, ou que apresentem selo de qualidade rompido ou violado;
- Recomenda-se a leitura da diretriz aprovada para "Proteção de Trabalhadores de Laboratório e Infecções Obtidas no Trabalho - CLSI® M29-A" para o manuseio seguro;
- Para acondicionamento e descarte do material usado, autoclavar a 121°C por 20 minutos. Recomendamos o uso dos sacos DetriLab.
- Os procedimentos de manuseio referentes ao processamento e manuseio para o descarte deverá estar de acordo com a RDC 222, DE 28 DE MARÇO DE 2018 que dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde.

5. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS (porém não fornecidos)

- Estufa bacteriológica;
- Alças bacteriológicas;
- Bico de Bunsen;
- Incubadores (para incubar com tensão de CO₂);
- Geradores de ambiente.

6. PROCEDIMENTO TÉCNICO

a- Retirar as placas e os discos da geladeira cerca de 20 a 30 minutos para que adquiram a temperatura ambiente antes da execução da prova.

b- Utilizar para o antibiograma, colônias provenientes de cultura recente.

c- Com uma alça bacteriológica tocar na colônia a ser testada. Suspende-la em Mueller Hinton caldo ou em Salina estéril (NaCl 0,85%) até a obtenção de uma turvação compatível com a escala 0,5 de Mac Farland (4 a 1x10⁸ UFC/mL).

d- Embeber um swab estéril na suspensão bacteriana, comprimindo-o contra as paredes do tubo para tirar o excesso da suspensão. Semear em seguida de forma suave em pelo menos 5 direções na placa, abrangendo toda a superfície;

e- Aguardar aproximadamente 10 a 15 minutos para a superfície do agar secar;

f- Com auxílio de uma pinça flambada e resfriada, colocar os monodiscos ou multidiscos, sobre a superfície do meio inoculado, exercendo uma leve pressão com a ponta da pinça para uma boa adesão dos discos;

g- Incubar a placa com os discos em estufa bacteriológica a 35 ±2°C por 16 a 18 horas, em tensão de CO₂;

h- Após incubação, realizar medição dos halos sob luz refletida

7. RESULTADOS

- Com o auxílio de uma régua ou paquímetro medir o diâmetro dos halos inibitórios de cada disco.
- Consultar a tabela apropriada no documento M100 (CLSI) para determinar a sensibilidade ao antimicrobiano testado.
- Liberar os resultados como sensível, intermediário ou resistente, dependendo dos diâmetros das zonas obtidos.

8. LIMITAÇÕES DO MÉTODO

(Riscos Residuais Identificados conforme RDC 35/2015)

Os resultados falsamente positivos ou negativos podem ocorrer, com maior frequência, nas seguintes situações:

- Inóculo diferente de 0,5 da Escala de Mac Farland. Inóculos mais carregados fornecem resultados falsamente positivos e inóculos mais fracos fornecem resultados falsamente negativos. A suspensão de 0,5 McFarland conterá aproximadamente 1 a 4 × 10⁸ UFC/mL. Cuidados devem ser tomados na preparação desta suspensão, pois concentrações mais elevadas de inóculo podem levar a resultados falsos-resistentes com alguns agentes antimicrobianos β-lactâmicos, particularmente quando testadas as cepas produtoras de β-lactamase de *H. influenzae*.

- Tempo longo entre a semeadura da amostra e análise. Ao utilizar colônias isoladas em um período superior a 24 horas, o metabolismo bacteriano pode ficar comprometido e a leitura de alguns parâmetros podem consequentemente ficar defasados ou até mesmo não ocorrer. Em colônias recentes (inferior ao período de 18 horas) não se encontram com o metabolismo bem definido, e algumas provas podem não ocorrer.

- Incubação em temperatura inadequada.
- Utilização de agulha flambada não resfriada.

- Interpretação equivocada de resultados.

- Técnica de assepsia inadequada.

- Tempo excessivo ou insuficiente de incubação. Tempo excessivo de incubação fornece resultados falsamente positivos e tempo insuficiente fornece resultados falsamente negativos.

- Utilização de material vencido, contaminado ou em condições inadequadas.

- Contaminação cruzada por uso de acessórios não esterilizados corretamente ou ambiente não asséptico.

- Utilização de meios de cultura com aparência alterada.

- Não aguardar para que os materiais atinjam a temperatura ambiente no momento do uso.

- A não incubação dos tubos com a tampa frouxa pode ocasionar falsos resultados negativos.
- A não utilização de reativo fornecido juntamente com os tubos pode ocasionar falsos resultados negativos ou positivos.
- Erro na conservação do produto pode ocasionar desidratação do meio e alteração das propriedades dos componentes
- Um encolhimento excessivo deste meio devido a dessecação pode dar origem a resultados falsos de sensibilidade.
- A utilização de suplementos químicos delicados na formulação pode acarretar leve foto sensibilidade, recomenda-se proteger o produto da incidência direta da luz.
- Algumas variações de coloração na colônia, morfologia e tamanho podem ocorrer, devido a características únicas da cepa analisada.
- A presença de mais de uma variante genética intrínseca a cepa analisada, pode interferir nas características de crescimento. É possível que características únicas ou mutadas das cepas possam interferir no desempenho do meio de cultura afetando ou retardando o total desenvolvimento das colônias.
- Com o trimetoprim e as sulfonamidas, os antagonistas do meio poderão permitir um ligeiro crescimento. Ignore este crescimento (inferior ou igual a 20% da extensão da zona de crescimento), medindo a margem mais óbvia.
- Os meios devem ter espessura de 4 mm não podendo ser inferiores a (podendo provocar resultados falsamente aumentados ou diminuídos);
- Utilizar no máximo 6 discos nas placas de 90x15mm.
- Observar critérios para escolha dos antibióticos apropriados para a bactéria em análise e suas resistências intrínsecas;
- Aguardar para que os materiais atinjam a temperatura ambiente no momento do uso, e guardá-los em temperatura apropriada imediatamente após o uso;
- O uso de swabs com base de algodão e/ou haste de madeira não são recomendados. Vários trabalhos mostraram que os ácidos graxos naturais presentes no material interferem no crescimento bacteriano;
- Com algumas combinações de microrganismos-agente antimicrobiano, a zona de inibição poderá não ter um limite bem demarcado, o que poderá conduzir a interpretações incorretas.

9. CONTROLE DA QUALIDADE

- *Materiais necessários*

Cepas padrão: ATCC® (American Type Culture Collection) ou derivadas).

- *Controle de qualidade recomendado:*

Parâmetro	Incubação	Resultado esperado
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC® 49247 (Ampicilina)	35°C/ 16-18h CO ₂ – 5-7%	Consultar Tabela: "Disk Diffusion: Quality Control Ranges for Fastidious Organisms", documento M100 do CLSI.
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC® 49247 (Cloranfenicol)		
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC® 49247 (Sulfazotrim)		
Meio não inoculado		Meio sólido levemente opaco, com coloração bege a levemente amarelada, podendo conter precipitados finos e negros no meio. Espessura do meio: no centro mínimo de 4 mm e na borda máximo de 5 mm.
Espessura no meio (medir centro e borda)	4 mm	

- *Periodicidade*

Testar a cada novo lote recebido ou em periodicidade estabelecida pelo próprio laboratório.

- *Análise dos resultados*

Foi comparado o desempenho do ágar HTM, frente ao ágar Mueller Hinton e ágar Mueller Hinton Chocolate, utilizando 219 amostras com resultados de sensibilidade conhecidos. O ágar HTM apresentou concordância de 99,6% quando comparado ao ágar Mueller Hinton chocolate e de 95,4% quando comparado ao ágar Mueller Hinton.

As divergências de resultados se deram em duas amostras sabidamente resistentes onde o agar Mueller Hinton Chocolate apresentou resultados intermediário e sensível, e em cinco amostras sabidamente resistentes onde agar Mueller Hinton apresentou resultados sensíveis. Em todas essas amostras o agar HTM apresentou a sensibilidade esperada, ficando evidenciada a maior precisão na geração de halos de sensibilidade.

10. GARANTIA DA QUALIDADE

A Laborclin obedece ao disposto na Lei 8.078/90 - Código de Defesa do Consumidor. Para que o produto apresente seu melhor desempenho, é necessário que:

- O usuário conheça e siga rigorosamente o presente procedimento técnico;
- Os materiais estejam sendo armazenados nas condições indicadas;
- Os equipamentos e demais acessórios necessários estejam em boas condições de uso, manutenção e limpeza.

Antes de ser liberado para venda, cada lote do produto é submetido a testes específicos, que são repetidos periodicamente conforme calendário estabelecido pela empresa até a data de vencimento expressa em rótulo. Os certificados de análise de cada lote podem ser obtidos no site www.laborclin.com.br. Em caso de dúvidas ou quaisquer problemas de origem técnica, entrar em contato com o SAC - Serviço de Assessoria ao Cliente através do telefone 0800-0410027 ou pelo e-mail sac@laborclin.com.br. Quaisquer problemas que inviabilizem uma boa resposta do produto, que tenham ocorrido comprovadamente por falha da Laborclin serão resolvidos sem ônus ao cliente, conforme o disposto em lei.

11. REFERÊNCIAS

1. Bush, K and Jacoby, GA. Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, V. 54(3), p. 969–976, 2010.
2. CLSI. Suggested Grouping of US-FDA Approved Antimicrobial Agents That Should Be Considered for Routine Testing and Reporting on Nonfastidious Organisms by Clinical Laboratories. 27ed. CLSI guideline M100-S27. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Institute, 2017.
3. CLSI. Verification of Commercial Microbial Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing Systems. 1ed. CLSI guideline M52. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Institute, 2015.
4. Difco Manual, 2 ed, 2009.
5. Doern, G.V., G.S. Daum, and T.A. Tubert. 1987. In vitro chloramphenicol susceptibility testing of *Haemophilus influenzae*: disk diffusion procedures and assays for chloramphenicol acetyltransferase. *J. Clin. Microbiol.* 25:1453-1455.
6. Doern, G.V. and R.N. Jones. 1988. Antimicrobial susceptibility testing of *Haemophilus influenzae*, *Branhamella catarrhalis*, and *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32:1747-1753.
7. Koneman, Elmer; *et al.* Diagnostic Microbiology. Lippincott, USA, 6th ed., 2010.
8. Mahon, Connie, Manuselis, George Jr. Diagnostic Microbiology. Saunders, USA, 1995.
9. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA NACIONAL DE ASSISTÊNCIA À SAÚDE. Manual de procedimentos básicos em microbiologia clínica para o controle da infecção hospitalar. Brasília, 1991.
10. Murray, P.R. *et al.* Manual of Clinical Microbiology. 7th ed, American Society for Microbiology 1999.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1984. Approved standard: M2-A3. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 3rd ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa. PA-254058.06 - 6 -
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1987. Second Informational Supplement: M100-S2. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
13. Woods, G.L., and J.A. Washington. 1995. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods, p. 1327-1341. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. USA.



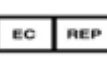
Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda

CNPJ 76.619.113/0001-31
Insc. Estadual 1370012926
Rua: Casimiro de Abreu, 521
Pinhais/PR CEP 83.321-210
Telefone: (41) 3661-9000
www.laborclin.com.br

Responsável Técnico:

Maire Wakamori – CRF/PR-20176
Serviço de Assessoria ao Cliente
SAC 0800-0410027
sac@laborclin.com.br

ANEXO 1 – LISTA DE SÍMBOLOS UTILIZADOS NOS RÓTULOS

	Código do produto		Número de lote
	Número de série		Fabricante
	Consultar instruções para utilização		Validade
	Temperatura de armazenagem (limite de temperatura)		Produto para saúde para diagnóstico <i>in vitro</i> .
	Não utilizar se a embalagem estiver danificada		Representante autorizado na Comunidade Européia
	Quantidade suficiente para <n> ensaios		Frágil, manusear com cuidado
	Esterilizado utilizando técnicas assépticas de processamento		Esterilização utilizando óxido de etileno
	Esterilização utilizando irradiação		Esterilizado utilizando vapor ou calor seco.
	Risco biológico		Cuidado. Importante consultar instruções de uso.
	Controle		Controle Negativo
	Controle Positivo		Manter seco
	Manter afastado da luz solar e longe do calor		Somente para avaliação de desempenho
	Não utilizar		Não reesterilizar

Fonte: ABNT NBR ISO 15223-1 – Terceira edição (24.08.2022)