

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.ULAC.030 - PáginaPágina 1/11	
Título do Documento	PREPARAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA	Emissão: 30/07/2020 Versão: 1.0	Próxima revisão: 30/07/2022

1. OBJETIVO

Descrever as instruções básicas para a preparação dos meios de cultura utilizados no setor de microbiologia do Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW).

2. MATERIAIS

- Meios de cultura em pó;
- Placas de petri;
- Bico de Bunsen;
- Autoclave;
- Tubos de vidro 11x100 mm com tampa de rosca;
- Balança;
- Água destilada;
- Provetas;
- Balão de fundo chato;
- Fogão.

3. DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO

3.1. Procedimentos gerais

- Usar Equipamento de Proteção Individual (EPIs) para o preparo de meios de cultura (máscaras, jaleco de manga longa e touca);
- Observar os riscos indicados nos rótulos dos frascos de meios de culturas e de reagentes químicos e fazer uso de EPIs específicos;
- Usar vidrarias limpas, secas e sem trincos ou defeitos;
- Utilizar vidraria em vidro neutro temperado, termo resistente com parede uniforme;
- Esterilizar a vidraria pelo processo de calor seco;
- Usar água destilada, deionizada, ou produzida por osmose reversa na preparação de meios de cultura e soluções;

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.ULAC.030 - PáginaPágina 2/11	
Título do Documento	PREPARAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA	Emissão: 30/07/2020	Próxima revisão: 30/07/2022
		Versão: 1.0	

- Os meios comerciais devem ser hidratados em pequena quantidade de água até que todo o meio fique úmido e só depois deve-se acrescentar o restante da água;
- Dissolver os meios líquidos e soluções com agitação e leve aquecimento (não deixar ferver);
- Aquecer os meios contendo Ágar até ferver com constante agitação. A parede da vidraria deve estar lisa sem pontos de Ágar. Caso observe pontos, a fervura não foi suficiente para a total dissolução. Retornar ao fogo para finalizar o procedimento;
- Sempre que for necessário o aquecimento dos meios, usar vidro termo resistente tipo Pyrex e aquecer sobre a tela de amianto ou similar e tripé, no bico de Bunsen ou em placa aquecedora;
- Usar sempre luvas térmicas apropriadas para laboratório para manipular vidrarias quentes;
- Normalmente, o tempo de esterilização em autoclave é de 15 minutos e a temperatura de 121°C;
- Obedecer às recomendações do fabricante;
- Quando distribuir o meio após a autoclavação, os tubos, frascos, placas, pipetas e vidrarias ou materiais auxiliares obrigatoriamente devem ser estéreis;
- Autoclavar os meios com as tampas semiabertas, para que a esterilização seja por igual em todo o conteúdo dos tubos. Tampas fechadas não permitem a entrada do vapor.

3.2. Preparo dos meios de cultura

3.2.1. Ágar sangue

Meio base – ágar tríptico de soja (TSA) ou ágar Columbia Sangue de Carneiro

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Autoclavar a 121°C por 15 minutos;
- Retirar da autoclave e resfriar até 50°C;
- Adicionar 50mL de sangue de carneiro para cada litro de meio base;
- Deixar esfriar à temperatura ambiente.

Validade: 4 meses, se conservado embalado de 2 a 8 °C.

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.ULAC.030 - PáginaPágina 3/11	
Título do Documento	PREPARAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA	Emissão: 30/07/2020	Próxima revisão: 30/07/2022
		Versão: 1.0	

3.2.2. Ágar chocolate

Meio base – ágar tríptico de soja (TSA) ou ágar Columbia

Sangue de Carneiro

Suplemento VX

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Autoclavar a 121°C por 15 minutos;
- Retirar da autoclave e resfriar até 50°C;
- Adicionar 50mL de sangue de carneiro para cada litro de meio base;
- Homogeneizar em fogo brando até achocolatar o meio;
- Resfriar o meio até 50°C e adicionar assepticamente o suplemento VX (10mL de suplemento/litro de meio);
 - Distribuir assepticamente em placas de Petri;
 - Deixar em temperatura ambiente até esfriar.

Validade: 3 meses, se conservado embalado de 2 a 8 °C.

3.2.3. Ágar CLED

Meio de CLED

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Autoclavar a 121°C por 15 minutos;
- Distribuir 20 a 25mL em placas de Petri estéreis;
- Deixar esfriar em temperatura ambiente.

Validade: 4 meses, se conservado embalado de 2 a 8 °C.

3.2.4. Ágar MacConkey

Meio de ágar MacConkey

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.ULAC.030 - PáginaPágina 4/11	
Título do Documento	PREPARAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA	Emissão: 30/07/2020	Próxima revisão: 30/07/2022
		Versão: 1.0	

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Autoclavar a 121°C por 15 minutos;
- Deixar esfriar até 60°C e distribuir 25mL em cada placa estéril;
- Deixar solidificar à temperatura ambiente.

Validade: 4 meses, se conservado embalado de 2 a 8 °C.

3.2.5. Ágar manitol

Meio de manitol

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Autoclavar a 121°C por 15 minutos;
- Deixar esfriar até 60°C e distribuir 25mL em cada placa estéril;
- Deixar solidificar à temperatura ambiente.

Validade: 4 meses, se conservado embalado de 2 a 8 °C

3.2.6. Ágar Mueller-Hinton

Meio Mueller-Hinton ágar

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Acertar o pH (7,2-7,4)
- Autoclavar a 121°C por 15 minutos;
- Retirar da autoclave e medir novamente o pH
- Distribuir 50 a 60mL em cada placa
- Deixar resfriar à temperatura ambiente.

Validade: 4 meses, se conservado embalado de 2 a 8 °C.

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.ULAC.030 - PáginaPágina 5/11	
Título do Documento	PREPARAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA	Emissão: 30/07/2020 Versão: 1.0	Próxima revisão: 30/07/2022

3.2.7. Ágar SS

Meio de SS ágar

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Aquecer o meio até dissolver (evitar superaquecimento do meio). Não autoclavar;
- Resfriar até 50°C e distribuir 20 a 25mL em placas de Petri estéreis;
- Deixar à temperatura ambiente até esfriar.

Validade: 4 meses, se conservado embalado de 2 a 8 °C.

3.2.8. Ágar Bile Esculina

Meio de bile esculina

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Aquecer sob constante agitação, até completa dissolução do ágar;
- Distribuir 3mL em tubos de 11 x 100mm com tampa de rosca;
- Autoclavar a 121°C por 15 minutos;
- Retirar da autoclave e inclinar os tubos com ângulo de 45° para formar uma superfície inclinada no ágar.

Validade: 6 meses, se conservado embalado de 2 a 8 °C.

3.2.9. Citrato de Simmons

Meio de ágar citrato (citrato de Simmons)

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Aquecer sob agitação constante até dissolver o ágar;
- Distribuir 3mL em tubos de 11 x 100mm com tampa de rosca;
- Autoclavar a 121°C por 15 minutos;
- Retirar da autoclave, inclinar os tubos com ângulo de 45° e deixar solidificar;

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.ULAC.030 - PáginaPágina 6/11	
Título do Documento	PREPARAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA	Emissão: 30/07/2020 Versão: 1.0	Próxima revisão: 30/07/2022

- Fechar bem a tampa do tubo.

Validade: 6 meses, se conservado embalado de 2 a 8 °C.

3.2.10. Ágar DNase

Ágar DNase

Solução de ácido clorídrico 1N

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Autoclavar a 121°C por 15 minutos;
- Deixar esfriar até 50°C e distribuir 20 a 25mL em placas de Petri;
- Deixar solidificar à temperatura ambiente.

Validade: 3 meses, se conservado embalado de 2 a 8 °C.

3.2.11. Ágar fenilalanina

Meio de fenilalanina ágar

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Distribuir 3mL em tubos com tampa de rosca de 11 x 100mm;
- Autoclavar a 121°C por 15 minutos com as tampas semirrosqueadas;
- Retirar da autoclave, rosquear as tampas e inclinar os tubos em ângulo de 45° para formar uma superfície no meio.

Validade: 6 meses, se conservado embalado de 2 a 8 °C.

3.2.12. Hektoen

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Aquecer o meio até dissolver (evitar superaquecimento do meio). Não autoclavar;
- Resfriar até 50°C e distribuir 20 a 25mL em placas de Petri estéreis;
- Deixar à temperatura ambiente até esfriar.

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.ULAC.030 - PáginaPágina 7/11	
Título do Documento	PREPARAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA	Emissão: 30/07/2020 Versão: 1.0	Próxima revisão: 30/07/2022

Validade: 3 meses, se conservado embalado de 2 a 8 °C.

3.2.13. OF – Meio para oxidação e fermentação (meio base)

Meio base de OF

Carboidratos (dextrose ou glicose, lactose, sacarose, xilose, maltose, manitol etc.)

Vaselina líquida estéril

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Aquecer o meio até dissolver todo o ágar (esse processo é demorado, mas importante)
- Separar em volumes iguais em diferentes balões de fundo chato, dependendo do número de carboidratos que serão preparados;
 - Adicionar 1g do carboidrato para cada 100mL de meio base e homogeneizar;
 - Distribuir 2mL em tubos com tampa de rosca de 11 x 100mm;
 - Esterilizar em vapor fluente por 20 minutos (deixar a válvula da pressão da autoclave aberta e, quando estiver saindo bastante vapor, começar a marcar o tempo);
 - Deixar esfriar à temperatura ambiente.

Validade: 6 meses, se conservado embalado de 2 a 8 °C.

3.2.14. Ágar-base ureia (Christensen)

Meio de ureia ágar

Solução de ureia a 40% (ureia 40g / água destilada 100mL)

Homogeneizar e esterilizar por filtração (Millipore 0,22µ)

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Autoclavar a 121°C por 15 minutos;
- Resfriar até 50°C e adicionar asepticamente 5mL da solução de ureia a 40% em 100mL do meio base;
 - Homogeneizar e distribuir 3mL do meio asepticamente em tubos estéreis;
 - Inclinare os tubos em ângulo de 45° para obter uma superfície inclinada

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.ULAC.030 - PáginaPágina 8/11	
Título do Documento	PREPARAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA	Emissão: 30/07/2020	Próxima revisão: 30/07/2022
		Versão: 1.0	

Validade: 6 meses, se conservado embalado de 2 a 8 °C.

3.2.15. Meio Stuart

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Fundir completamente;
- Distribuir 7mL por tubo;
- Esterilizar em autoclave;
- Após retirar da autoclave, manter os tubos em posição vertical para que solidifiquem;
- pH: 7,4 +/- 0,2 (25°C).

Validade: 1 a 2 semanas, se conservado embalado de 2 a 8 °C.

3.2.16. Ágar Indol Sulfeto Motilidade (SIM)

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Aquecer sob agitação, até fundir o meio;
- Distribuir aproximadamente 3,0mL em tubos com tampas de rosca;
- Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos;
- Retirar os tubos da autoclave;
- Deixar solidificar em temperatura ambiente na posição vertical.

Validade: 6 meses, se conservado embalado de 2 a 8 °C.

3.2.17. Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI)

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Ajustar o pH para 7,3 ±0,2;
- Distribuir em tubos com tampas de rosca;
- Esterilizar em autoclave;
- Retirar os tubos da autoclave e incliná-los ainda quentes para que solidifiquem com a superfície inclinada (ângulo de 45°);

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.ULAC.030 - PáginaPágina 9/11	
Título do Documento	PREPARAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA	Emissão: 30/07/2020	Próxima revisão: 30/07/2022
		Versão: 1.0	

- Deixar solidificar em temperatura ambiente.

Validade: 6 meses, se conservado embalado de 2 a 8 °C.

3.2.18. Meio Motilidade, Indol, Ornitina (MIO)

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Aquecer sob agitação, até fundir o meio;
- Distribuir aproximadamente 3,0 mL em tubos com tampa de rosca;
- Esterilizar em autoclave;
- Retirar os tubos da autoclave;
- Deixar solidificar em temperatura ambiente na posição vertical.

Validade: 3 meses, se conservado embalado de 2 a 8 °C.

3.2.19. Brain Heart Infusion (BHI)

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Distribuir 3,0mL em tubos com tampa de rosca;
- Esterilizar em autoclave;
- Retirar os tubos da autoclave;
- Deixar esfriar em temperatura ambiente;
- pH: 7,4 +/- 0,2 (25°C).

Validade: 3 meses, se conservado embalado de 2 a 8 °C.

3.3 CONTROLE DE QUALIDADE

O teste de esterilidade é realizado colocando o meio de cultura sem ter sido inoculado previamente em estufa a 35 ±2°C por 24 horas. Não deve haver mudança de cor nem crescimento de qualquer colônia.

Para o controle de crescimento, sempre que possível usar cepas ATCC ou culturas comerciais com propriedades equivalentes comprovadas para avaliação de desempenho dos meios de cultura e de outras soluções preparadas no laboratório.

Após o teste, embalar os meios em papel filme, colocar etiquetas com a data de



Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.ULAC.030 - PáginaPágina 10/11	
Título do Documento	PREPARAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA	Emissão: 30/07/2020	Próxima revisão: 30/07/2022
		Versão: 1.0	

fabricação e validade e guardar na geladeira reservada para os meios de cultura.

4. REFERÊNCIAS

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Manual de Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica para o Controle de Infecções Hospitalares**. <Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_procedimentos_microbiologiaclinica_control_e_infechospitalar.pdf>. Acesso em: 21 de maio de 2020.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecções em Serviços de Saúde**. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_microbiologia_completo.pdf>. Acesso em: 21 de maio de 2020.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA/MEDICINA LABORATORIAL (SBPC/ML). **Boas Práticas em Microbiologia Clínica**. Disponível em: <<http://www.sbpc.org.br/upload/conteudo/Microbiologia.pdf>>. Acesso em: 21 de maio de 2020.

OPLUSTIL, Carmen Paz. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2010.

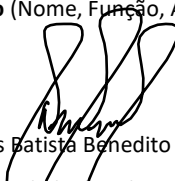
PILONETO M, PILONETO DV. **Manual de Procedimentos Laboratoriais em Microbiologia - POPs em Microbiologia**. Microsciense, Curitiba, 1998.



Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.ULAC.030 - PáginaPágina 11/11	
Título do Documento	PREPARAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA	Emissão: 30/07/2020	Próxima revisão: 30/07/2022
		Versão: 1.0	

5. HISTÓRICO DE REVISÃO

VERSÃO	DATA	DESCRIÇÃO DA ALTERAÇÃO
1.0	30/07/2020	Elaboração do documento.

<p>Elaboração</p> <p>Adriana Nogueira Antonio Francisco A. Gonçalves Deborah Gomes B. Pinto Larissa Rodrigues dos Santos Silva Tatiana Simões Pontes</p>	<p>Data: 30/07/2020</p>
<p>Revisão:</p> <p>Albalucia Costa Carvalho Humberto de Carvalho Aragão Neto Viviane Araújo da Silva</p>	<p>Data: 05/10/2020</p>
<p>Validação</p> <p>Larycia Vicente Rodrigues – Setor de Gestão da Qualidade e Vigilância em Saúde</p>	<p>Data: 01/10/2021</p>
<p>Aprovação (Nome, Função, Assinatura)</p>  <p>Dr. Rubens Batista Benedito – Farmacêutico Chefe da Unidade de Laboratório de Análises Clínicas</p>	<p>Data: 10/11/2021</p>