



BD CHROMagar Orientation Medium / Columbia CNA Agar (Biplate)

UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O **BD CHROMagar Orientation Medium / Columbia CNA Agar (Biplate)** (Meio de orientação CHROMagar / Ágar de Columbia CNA) (Biplaca) é utilizado para o isolamento de bactérias normalmente envolvidas nas infecções do aparelho urinário. Embora o **CHROMagar Orientation Medium** não seja um meio selectivo para o isolamento, identificação ou diferenciação dos agentes patogénicos do aparelho urinário, o Columbia CNA Agar constitui um meio selectivo para o isolamento de bactérias Gram positivas.

PRINCÍPIOS E EXPLICAÇÃO DO PROCEDIMENTO

Método microbiológico.

CHROMagar Orientation Medium: A *Escherichia coli*, os enterococos e os grupos *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* e *Proteus-Morganella-Providencia* são os organismos mais frequentemente responsáveis pelas infecções do aparelho urinário (=IAU). Entre sessenta e 70% das IAU são provocadas pela *E. coli* em cultura pura ou juntamente com enterococos. O *Staphylococcus saprophyticus* e o *Streptococcus agalactiae* são, embora menos frequentemente, encontrados nas IAU das mulheres.

Alguns dos organismos envolvidos produzem enzimas quer para o metabolismo da lactose, quer dos glucosídeos quer de ambos, ao passo que outros não produzem nenhuma destas enzimas. Como exemplo, a *E. coli* produz enzimas provenientes do metabolismo da lactose, mas é negativa para a β -glucosidase. Outros membros da família *Enterobacteriaceae* são positivos para a β -glucosidase, mas não contêm as enzimas necessárias para a fermentação da lactose, podendo outros conter os dois tipos de enzimas ou mesmo nenhuma delas. As beta-glucosidasas também se encontram nos cocos Gram positivos como, por exemplo, os *Enterococcus* spp. e os *Streptococcus agalactiae*. A triptofano deaminase (TDA) é uma enzima que se encontra caracteristicamente no grupo de organismos *Proteus-Morganella-Providencia*. O **CHROMagar Orientation Medium** permite a identificação de *E. coli*, dos enterococos e da maioria das estirpes de *Staphylococcus saprophyticus* e *S. simulans* directamente na placa de isolamento; além disso, é possível realizar uma detecção dos grupos *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* (=KES) e *Proteus-Morganella-Providencia* (=PMP) através da coloração da colónia e do meio.¹⁻³ Uma vez que o **CHROMagar Orientation Medium** não é selectivo, desenvolver-se-ão outros agentes patogénicos das IAU, sendo, no entanto, necessários testes bioquímicos para a sua identificação.

O **CHROMagar Orientation Medium** foi desenvolvido por A. Rambach e é comercializado pela BD Diagnostic Systems no âmbito de um acordo de licença com a CHROMagar, Paris, França. No **CHROMagar Orientation Medium**, as peptonas especialmente seleccionadas para o efeito fornecem os nutrientes. A mistura de cromogénios é composta por substratos artificiais (cromogénios), que libertam compostos de várias cores na sequência da degradação por enzimas microbianas específicas, assegurando assim a diferenciação directa de determinadas espécies, ou a detecção de determinados grupos de organismos, utilizando apenas um número mínimo de testes de confirmação.

Columbia CNA Agar: Ellner et al. referiram o desenvolvimento de uma nova formulação de sangue de ágar, que foi designada como ágar de Columbia.⁴ Este meio, onde se verifica a existência de colónias de maior dimensão e um crescimento mais exuberante do que nas bases de ágar de sangue comparáveis, é utilizado para os meios que contêm sangue e para formulações selectivas. Ellner et al. descobriram que um meio com 10 mg de colistina e 15 mg de ácido nalidíxico por litro numa base de ágar de Columbia, enriquecido com sangue de ovelha a 5%, suporta o crescimento de estafilococos, estreptococos hemolíticos e enterococos e, ao mesmo tempo, inibe o crescimento das espécies de *Proteus*, *Klebsiella* e *Pseudomonas*.⁴

O ágar de Columbia fornece um meio com uma base altamente nutritiva. A adição de agentes antimicrobianos, colistina e ácido nalidíxico torna o meio selectivo relativamente a microorganismos gram-positivos, em especial os estreptococos e os estafilococos. O sangue de ovino é adicionado ao meio de modo a permitir a detecção de reacções hemolíticas.^{4,5}

REAGENTES

BD CHROMagar Orientation Medium / Columbia CNA Agar (Biplate)

Fórmulas* aproximadas por litro de água purificada

CHROMagar Orientation Medium	
Cromopectonas	16,1 g
Mistura cromogénica	1,3
Ágar	15,0

pH 6,9 ± 0,2

Columbia CNA Agar			
Hidrolisado pancreático de caseína	12,0 g	Cloreto de sódio	5,0 g
Hidrolisado péptico de tecido animal	5,0	Ágar	13,5
Extracto de leveduras	3,0	Colistina	0,01
Extracto de bovino	3,0	Ácido nalidíxico	0,015
Amido de milho	1,0	Sangue de ovino, desfibrinado	5%

pH 7,3 ± 0,2

*Ajustada e/ou suplementada conforme necessário para cumprir os critérios do desempenho.

PRECAUÇÕES

IVD . Apenas para uso profissional. ⓧ

Não utilizar as placas que apresentem sinais de contaminação microbiana, descoloração, secura, fissuras ou outros sinais de deterioração.

Consultar as **INSTRUÇÕES GERAIS DE UTILIZAÇÃO** para informação sobre os procedimentos de manuseamento asséptico, os riscos biológicos e os procedimentos de eliminação do produto usado.

ARMAZENAMENTO E PRAZO DE VALIDADE

Após recepção das placas, conservar **no escuro** a uma temperatura entre 2 e 8°C, dentro do invólucro original até ao momento da utilização. Evitar congelar e aquecer excessivamente. As placas podem ser inoculadas até ao prazo de validade (ver a etiqueta da embalagem) e incubadas durante o tempo de incubação recomendado.

As placas são fornecidas em pilhas de 10 e, quando uma destas pilhas é aberta, as respectivas placas terão de ser utilizadas no prazo máximo de uma semana, se forem conservadas em local limpo a uma temperatura entre 2 e 8°C. **Minimizar a exposição à luz antes e durante a incubação, uma vez que esta poderá destruir os cromogénios incluídos no CHROMagar Orientation Medium.**

CONTROLO DE QUALIDADE PELO UTILIZADOR

Inocular amostras representativas com as seguintes estirpes (para mais detalhes, consultar as **INSTRUÇÕES GERAIS DE UTILIZAÇÃO**). Incubar as placas em condições aeróbias, a uma temperatura entre 35 e 37°C, por um período nunca inferior a 20 a 24 h.

Estirpes de teste	CHROMagar Orientation Medium	Columbia CNA Agar
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Crescimento bom a excelente; colónias pequenas, azul-esverdeado a azul	Crescimento bom a excelente; colónias cinzentas; ausência de hemólise
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 12386	Crescimento razoável a bom; colónias muito pequenas de cor azul	Crescimento razoável a excelente; colónias brancas a cinzentas; beta-hemólise
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Crescimento bom a excelente; colónias brancas a amareladas	Crescimento bom a excelente; colónias esbranquiçadas, beta-hemólise
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Crescimento razoável a excelente; colónias de tamanho médio, transparentes, vermelho claras	Inibição completa
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 27736	Crescimento bom a excelente; colónias de tamanho médio, azul forte, com ou sem halos azuis	Inibição parcial a completa
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427	Crescimento razoável a excelente; colónias de cor azul-verde; o meio circundante é de cor âmbar a castanho	Inibição parcial a completa
Não inoculadas	Incolor a âmbar muito claro, transparente (pode conter uma quantidade ligeira a moderada de pequenas partículas)	Vermelho (cor de sangue)

PROCEDIMENTO

Materiais fornecidos

BD CHROMagar Orientation Medium / Columbia CNA Agar (biplacas **Stacker** de 90 mm). Microbiologicamente controlado.

Materiais não fornecidos

Meios de cultura auxiliares, reagentes e equipamento laboratorial, conforme necessário.

Tipos de amostra

O **BD CHROMagar Orientation Medium / Columbia CNA Agar** destina-se exclusivamente ao isolamento, enumeração e diferenciação de bactérias na urina. É possível utilizar urina de jacto médio ou urina de cateterização ou urina colhida através de uma punção supra-púbica na bexiga (consultar também **CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO E LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO**). Cumprir as técnicas assépticas para a colheita de amostras de urina. A urina deve ser directamente espalhada no meio num período de tempo não superior a 2 h após a colheita ou deve ser mantida no frigorífico (por um período inferior a 24 h) para evitar o crescimento excessivo de agentes infecciosos ou contaminantes antes da inoculação deste meio.⁶⁻⁸

Procedimento do teste

Colher uma amostra de urina não diluída e bem misturada utilizando uma ansa calibrada (0,01 ou 0,001 mL). Para a inoculação de meios em biplacas, é preferível utilizar ansas de 0,001 mL (= 1 µL). Certificar-se de que é feita a aplicação adequada da amostra na ansa. Inocular primeiro a amostra numa pequena área de superfície do **CHROMagar Orientation Medium**; em seguida, inocular a área restante com este meio. Posteriormente, colher uma nova amostra da urina e proceder da mesma forma relativamente ao **Columbia CNA Agar**. Se forem utilizadas ansas de 10 µL, recomenda-se uma pré-diluição da amostra de urina de 1:10 em soro fisiológico estéril. Incubar a placa inoculada em posição invertida e em condições aeróbias, a uma temperatura entre 35 e 37°C, durante 20 a 24 h. Não é recomendável a incubação desta biplaca numa atmosfera enriquecida com dióxido de carbono. **Minimizar a exposição à luz durante a incubação, uma vez que esta poderá destruir os cromogénios incluídos no**

CHROMagar Orientation Medium. Assim que as cores das colónias se tiverem desenvolvido, poder-se-ão expor à luz.

A utilização de ansas calibradas ou de outras técnicas vulgarmente utilizadas para a colocação em placas de amostras de urina é obrigatória para a obtenção de colónias isoladas com as suas cores e formas típicas.

Resultados

Após a incubação, os meios devem apresentar colónias isoladas nas áreas onde o inóculo foi diluído correctamente. O **Esquema 1** deve ser utilizado para a identificação ou diferenciação e como linha de orientação para outros testes de confirmação no **CHROMagar Orientation Medium**. Pode utilizar-se uma coloração Gram e a microscopia para confirmar os resultados. No Columbia CNA Agar, ocorrerá crescimento se estiverem presentes bactérias Gram positivas. Para mais pormenores e interpretação do crescimento neste meio, consultar a bibliografia.^{5,9}

Testes de confirmação

Para o **CHROMagar Orientation Medium**, realizar testes de confirmação conforme necessário (**Esquema 1**). Não aplicar qualquer agente de detecção, como por exemplo indol com DMACA ou outros agentes, directamente sobre as colónias neste meio. Em vez disso, os testes devem ser realizados sobre papel de filtro com crescimento proveniente das respectivas colónias.

Não utilizar o reagente indol de Kovac para colónias de *E. coli*, uma vez que a respectiva cor pode interferir com a cor vermelha de um teste com indol positivo; em vez disso, utilizar reagente indol com dimetilaminocinamaldeído (DMACA).

Se forem utilizados outros testes de confirmação ou sistemas de identificação bioquímica, é necessário seguir as instruções destes testes ou sistemas.

Cálculo e interpretação dos resultados⁶⁻⁹

Contar o número de colónias (CFU) em cada um dos meios. Se tiver sido utilizada uma ansa de 0,001 mL, cada uma das colónias corresponde a 1000 CFU/mL de urina.⁷

Urina de jacto médio e cateterização: As linhas de orientação actuais indicam que para um único isolado uma densidade de $\geq 10^5$ CFU/mL indica infecção, $< 10^5$ CFU/mL indica contaminação uretral ou vaginal e entre 10^4 a 10^5 CFU/mL necessita de ser novamente avaliada com base na informação clínica.

As bactérias contaminantes aparecem normalmente em número reduzido com variações na morfologia das colónias.

Urina colhida através punção supra-púbica na bexiga: Uma vez que a bexiga é estéril em indivíduos não infectados, quaisquer cfu detectadas indicam uma infecção.

Utilizando este meio, os agentes patogénicos do aparelho urinário apresentarão geralmente contagens elevadas, com cor e morfologia uniforme das colónias.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO E LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

O **BD CHROMagar Orientation Medium / Columbia CNA Agar (Biplate)** é utilizado para o isolamento, identificação e presumível identificação de bactérias vulgarmente envolvidas nas infecções do aparelho urinário.

O **CHROMagar Orientation Medium** é um meio cromogénico para identificação directa, diferenciação e enumeração de agentes patogénicos comuns do aparelho urinário. O meio é apropriado para o isolamento de muitos microorganismos de crescimento aeróbio, como as *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* e outros bastonetes gram-negativos não fermentadores, os enterococos, os estafilococos e muitos outros provenientes de amostras de urina.¹⁻³

Permite a identificação directa de *Escherichia coli* pela cor da colónia e por um teste de confirmação com indol, bem como a identificação directa de *Enterococcus* e *Streptococcus agalactiae* por cor da colónia e por um teste de confirmação PIR ou, em alternativa, um teste de aglutinação serológica para a determinação do grupo Lancefield. É possível identificar outros organismos depois de realizar alguns testes de confirmação ou poderá ser necessária uma identificação bioquímica completa, dependendo das espécies. Uma vez que a maioria das infecções do aparelho urinário mais comuns são provocadas por *E. coli* e/ou por enterococos, a utilização deste meio reduz significativamente a carga de trabalho e o tempo para inocular e

efectuar a leitura dos sistemas de identificação que são necessários quando se utilizam meios convencionais para o isolamento.

O Columbia CNA Agar é um meio padrão para o isolamento e cultivo de muitos microorganismos gram-positivos de crescimento aeróbio como, por exemplo, os estreptococos, os estafilococos, os corineformes, a *Listeria spp* entre outros.^{5,7,9}

Resultados do desempenho^{2,10}

Foram realizadas duas avaliações independentes do desempenho no **CHROMagar Orientation Medium**. Nas duas avaliações, o meio cromogénico detectou, por comparação, uma maior quantidade de agentes patogénicos do que os meios tradicionais utilizados. As informações relativas à primeira avaliação foram publicadas e os resultados da primeira e da segunda avaliação encontram-se disponíveis no documento **Instruções de utilização do BD CHROMagar Orientation Medium** (no. de cat. 254102).²

Limitações do procedimento

CHROMagar Orientation Medium: As colónias que apresentam a sua cor natural e que não reagem com os substratos cromogénicos têm de ser submetidas a outros processos de diferenciação com os testes bioquímicos ou serológicos apropriados. Consultar a bibliografia.^{9,11} Outros bastonetes Gram negativos que não os pertencentes ao grupo KES podem produzir colónias grandes azuis, sendo, por isso, necessário realizar outros testes bioquímicos para a respectiva identificação.¹¹

Em casos muito raros, poderão encontrar-se presentes *Listeria monocytogenes* ou outras espécies de *Listeria* na urina (por exemplo, após um aborto provocado por estes agentes). A *Listeria* produzirá colónias de cor azul a azul-verde que são negativas quando submetidas ao teste PIR, à semelhança do que acontece com *Streptococcus agalactiae* (ver Esquema 1) Poderá, por isso, ser útil preparar uma coloração Gram de todas as estirpes que produzam neste meio colónias de dimensão pequena, de cor azul a azul-verde e que têm resultados negativos quando submetidas ao teste PIR. A presença de bastonetes Gram positivos pode ser um indicativo da espécie *Listeria*. São necessários outros testes bioquímicos para confirmar a presença destes agentes.

Em casos muito raros, os isolados de *Aeromonas hydrophila* podem produzir colónias cor-de-rosa a vermelho claro. Poderão diferenciar-se da *E. coli* através de um teste de oxidase (*Aeromonas* = positivo; *E. coli* = negativo).

Ocasionalmente, os estafilococos, que não o *S. saprophyticus*, que produzem resultados negativos quando testados para a coagulase (por exemplo, *S. simulans*, *S. xylosus* e *S. intermedius*), podem produzir colónias que assumem uma cor rosa a vermelho claro. Nestes isolados é, portanto, necessário realizar outros testes (ver Esquema 1).

O **CHROMagar Orientation Medium** não suportará o desenvolvimento de organismos exigentes como, por exemplo, a *Neisseria*, o *Haemophilus* ou o *Mycoplasma spp*.

A utilização deste meio para amostras clínicas e não clínicas que não a urina não foi validada. Antes da primeira utilização do **CHROMagar Orientation Medium**, recomenda-se que seja treinado o surgimento de colónias típicas com estirpes definidas, por exemplo, as estirpes descritas na secção **CONTROLO DE QUALIDADE PELO UTILIZADOR**.

Columbia CNA Agar: Neste meio, pode ocorrer o crescimento de bactérias que apresentam resistência aos ingredientes selectivos.

As espécies de *Candida* e outros fungos não são inibidos neste meio.

Embora sejam bactérias gram-positivas, os formadores de esporos aeróbios, como o *Bacillus spp.*, podem ser inibidos no ágar Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood.

Embora possam ser realizados alguns testes de diagnóstico directamente neste meio, para uma completa identificação é necessária a realização de testes bioquímicos e, se indicado, a realização de testes imunológicos usando culturas puras.

A base de ágar de Columbia contém um teor de hidratos de carbono relativamente elevado e, por essa razão, os estreptococos beta-hemolíticos poderão produzir uma reacção hemolítica esverdeada que pode ser confundida com a alfa-hemólise.

BIBLIOGRAFIA

1. Merlino, J., S. Siarakas, G. J. Robertson, G. R. Funnell, T. Gottlieb, and R. Bradbury. 1996. Evaluation of CHROMagar Orientation for differentiation and presumptive identification of gram-negative bacilli and *Enterococcus* species. J. Clin. Microbiol. 34: 1788-1793.
2. Hengstler, K.A., R. Hammann, and A.-M. Fahr. 1997. Evaluation of BBL CHROMagar Orientation medium for detection and presumptive identification of urinary tract pathogens. J. Clin. Microbiol. 35: 2773-2777.
3. Samra, Z., M. Heifetz, J. Talmor, E. Bain, and J. Bahar. 1998. Evaluation of use of a new chromogenic agar in detection of urinary tract pathogens. J. Clin. Microbiol. 36: 990-994.
4. Ellner, P.D., C.J. Stoessel, E. Drakeford, and F. Vasi. 1966. A new culture medium for medical bacteriology. Am. J. Clin. Pathol. 45:502-504.
5. MacFaddin, J. F. 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol. 1, p. 269-275. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
6. Barry, A.L., P.B. Smith, and M. Turck. 1975. Cumitech 2, Laboratory diagnosis of urinary tract infections. Coordinating ed., T.L. Gavan. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
7. Forbes, B.A., and P.A. Granato. Processing specimens for bacteria. 1995. In: Murray, P. R., 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.
8. Clarridge, J.E., M.T. Pezzlo, and K.L. Vosti. 1987. Cumitech 2A, Laboratory diagnosis of urinary tract infections. Coordinating ed., A.S. Weissfeld. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
9. Isenberg, H. D. (ed.). 1992. Interpretation of aerobic bacterial growth on primary culture media, Clinical microbiology procedures handbook, vol.1, p. 1.6.1-1.6.7. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
10. Data on file. BD Diagnostic Systems Europe, Heidelberg, Germany.
11. Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.). 2003. Manual of clinical microbiology, 8thed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

EMBALAGEM/APRESENTAÇÃO

BD CHROMagar Orientation Medium / Columbia CNA Agar (Biplate)

REF 254489

Meios em placas prontos a usar, 20 placas

REF 257727

Meios em placas prontos a usar, 120 placas

INFORMAÇÕES ADICIONAIS

Para obter informações adicionais, contacte o representante local da BD.



Becton Dickinson GmbH

Tullastrasse 8 – 12

69126 Heidelberg/Germany

Phone: +49-62 21-30 50 Fax: +49-62 21-30 52 16

Reception_Germany@bd.com

<http://www.bd.com>

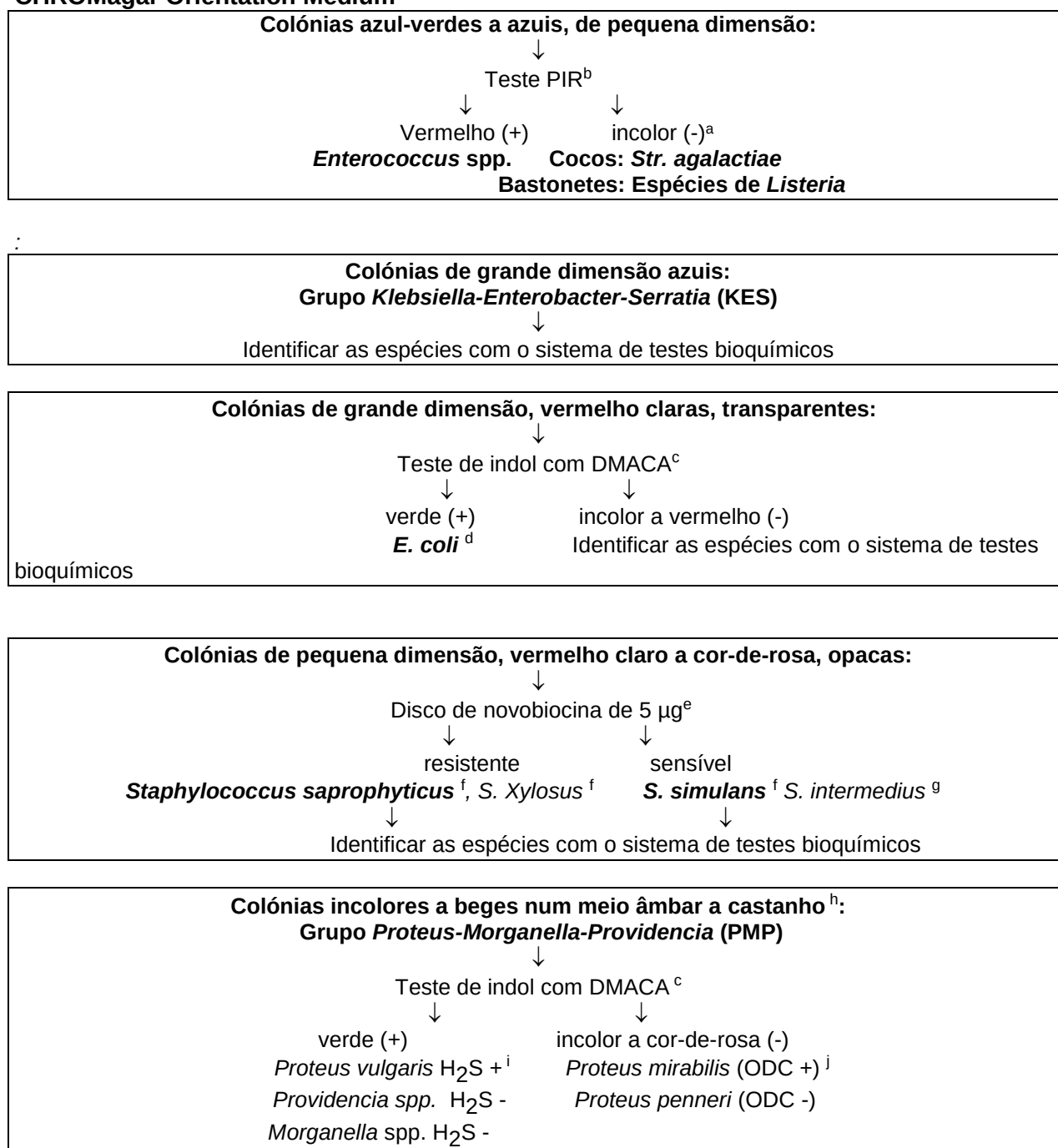
<http://www.bd.com/europe/regulatory/>

CHROMagar is a trademark of Dr. A. Rambach

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection

© 2019 BD. BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

Esquema 1: Linhas de orientação relativamente ao aspecto das colónias, ao desempenho de testes de confirmação e à diferenciação ou identificação resultantes em BD CHROMagar Orientation Medium



^a Coloração gram recomendada.

^b Teste de piroglutamato para pirrolidonil arilamidase. Podem utilizar-se testes serológicos para o agrupamento de Lancefield em vez de um teste PIR para a diferenciação de *Enterococcus* spp. de *Streptococcus agalactiae*.

^c DMACA= Reagente Dimetilaminocinamaldeído para produção de indol. Aplicar o reagente sobre papel de filtro e esfregar uma das colónias na área que contém o reagente no papel de filtro. Esperar 10 – 20 segundos. Uma cor **verde** é indicativa de produção de indol (vermelho ou incolor = negativo). Não utilizar o reagente de indol de Kovac para testar as colónias vermelhas claras!

^d Pode realizar-se um teste de oxidase em todas as colónias grandes vermelhas claras com resultados de indol positivos para excluir a presença de *Aeromonas* (=oxidase positivo).

^e Inocular espalhando o isolado numa placa de ágar de Mueller Hinton II. Colocar um disco de novobiocina (5 µg) sobre a placa inoculada. Incubar durante 18 a 24 h a uma temperatura entre 35 e 37°C e determinar o tamanho da zona de inibição (resistente: ≤ 16 mm, sensível: > 16 mm).

^f Conhecidos como agentes patogénicos humanos, também podem ser isolados a partir da urina.

^g Não é sabido que se possam isolar a partir de urina humana.

^h A cor âmbar a castanha deve-se à triptofano deaminase (TDA) positiva, comum a todos os organismos do grupo PMP. Cerca de 50% das estirpes de *P. vulgaris* produzem colónias azuis num meio âmbar a castanho

ⁱ Teste de sulfureto de hidrogénio convencional.

^j Teste de ornitina decarboxilase convencional.