



e

BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II) – Bi-Plate

L007379 • Rev. 12 • junho 2017

PROCEDIMENTOS DE CONTROLO DE QUALIDADE

I INTRODUÇÃO

O **BD BBL Group A Selective Strep Agar with 5% Sheep Blood (ssA)** — Ágar selectivo para estreptococos do grupo A com sangue ovino a 5%) é um meio selectivo utilizado para isolamento e identificação presumível de estreptococos pertencentes ao grupo A, provenientes de culturas da garganta e de outras amostras. O **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II)** — Ágar de soja **BD BBL Trypticase** com sangue ovino a 5%) é utilizado para cultura de microrganismos de crescimento lento e para visualização de reacções hemolíticas. Na placa dividida em duas metades, o sector do meio TSA II está marcado com "I" e o sector do meio **ssA** está marcado com "II".

II PROCEDIMENTO DO TESTE DE DESEMPENHO

A. **BD BBL Group A Selective Strep Agar with 5% Sheep Blood**

- Inocule amostras representativas com as culturas diluídas de forma a conter 10^3 a 10^4 UFC/0,01 mL.
 - Adicione 0,01 mL da diluição a cada placa, fazendo riscas para conseguir o isolamento. Perfure a área da primeira risca, antes de prosseguir para a restante placa.
 - Coloque um disco **BD BBL Taxo A** na intersecção da primeira e segunda áreas de sementeira em todas as placas inoculadas com estirpes de *S. pyogenes*.
 - Incube as placas a uma temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ numa atmosfera aeróbia suplementada com dióxido de carbono.
 - Inclua placas de **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II)** como controlos não selectivos para todos os microrganismos.
- Examine as placas após 18 a 24 h para verificar se ocorreu beta-hemólise na área perfurada, o grau de crescimento, a inibição, o tamanho da colónia e as reacções hemolíticas. Leia e registre o tamanho da zona em redor do disco **BD BBL Taxo A** com *S. pyogenes*.
- Resultados esperados

Microrganismos	ATCC	Isolamento
* <i>Streptococcus pyogenes</i>	19615	Crescimento razoável a elevado (dependendo da estirpe e da diluição) de colónias diminutas a muito pequenas, rodeadas por zonas de beta-hemólise. Em redor do disco BD BBL Taxo A é claramente evidente uma zona de inibição do crescimento.
<i>Streptococcus pyogenes</i>	51574	Inibição do crescimento.
<i>Streptococcus mitis</i>	6249	Inibição parcial
* <i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Inibição completa
<i>Neisseria subflava</i>	14799	Inibição completa
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	Inibição completa

*Estirpe do microrganismo recomendada para o controlo de qualidade do utilizador.

B. **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood**

- Inocule amostras representativas com diluições das culturas listadas abaixo.
 - Utilizando uma pipeta volumétrica ou um método equivalente, distribua 0,01 mL de uma diluição com 30 a 300 UFC em cada placa e espalhe o inóculo com uma espátula de vidro estéril.
 - Incube a estirpe de *Staphylococcus* a uma temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$, numa atmosfera aeróbia, e as estirpes de *Streptococcus* a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, numa atmosfera aeróbia suplementada com dióxido de carbono.
- Examine as placas após 18 a 24 h, verificando se existe crescimento, o tamanho das colónias e reacções de hemólise.
- Resultados esperados

Microrganismos de controlo do CLSI	ATCC	Isolamento
* <i>Streptococcus pyogenes</i>	19615	Crescimento, beta-hemólise
* <i>Streptococcus pneumoniae</i>	6305	Crescimento, alfa-hemólise
* <i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Crescimento
* <i>Escherichia coli</i>	25922	Crescimento

*Estirpe do microrganismo recomendada para o controlo de qualidade do utilizador.

III CONTROLO DE QUALIDADE ADICIONAL

- Examine as placas, conforme descrito em "Deterioração do produto".
- Examine visualmente as placas representativas, para assegurar que eventuais defeitos físicos não irão interferir com a utilização.
- Determine o pH, através de potenciometria, à temperatura ambiente, para cumprimento da especificação de pH de $7,4 \pm 0,2$ em ambos os meios.
- Durante o procedimento de inoculação, tenha atenção à solidez das placas.
- Incube as placas representativas não inoculadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 72 h e examine-as, verificando se existe contaminação microbiana.

INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO

IV UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O **BD BBL Group A Selective Strep Agar with 5% Sheep Blood (ssA)** é recomendado como meio em placa primário selectivo para isolamento primário de estreptococos do grupo A (*S. pyogenes*) provenientes de culturas da garganta e de outras amostras, nos quais há suspeita da presença de *S. pyogenes*. Os estreptococos do grupo B também irão crescer neste meio; a maior parte de outros estreptococos, espécies de *Neisseria*, estafilococos e bactérias Gram-negativas são inibidas. O meio foi concebido para ser utilizado em conjunto com discos **BD BBL Taxo A** (bacitracina, 0,04 unidades), para identificação presuntiva de *S. pyogenes*.

O **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II)** é utilizado para cultura de microrganismos de crescimento lento e para visualização de reacções hemolíticas produzidas por muitas espécies de bactérias.

V RESUMO E EXPLICAÇÃO

A infecção com estreptococos do grupo A de Lancefield (*S. pyogenes*) pode dar origem a sequelas graves como, por exemplo, febre reumática e glomerulonefrite aguda. Por isso, é importante fazer uma detecção e identificação precoces.

A composição nutricional do **BD BBL Trypticase Soy Agar** tornou-o um meio popular, quer como meio não suplementado, quer como base para meios contendo sangue. O **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II)** é largamente utilizado para isolamento e cultura de espécies microbianas de crescimento lento e para determinação de reacções hemolíticas, que são importantes características de diferenciação para bactérias, especialmente para espécies de *Streptococcus*.

Devido ao desenvolvimento excessivo da flora normal presente em amostras de culturas da garganta colocadas por rotina em placas com ágar de sangue, foram acrescentados ingredientes selectivos ao ágar de sangue ovino de modo a potenciar a detecção dos estreptococos do grupo A.

A avaliação de vários agentes antimicrobianos nos nossos laboratórios resultou numa combinação com melhor selectividade relativamente a outros meios selectivos testados. Este meio (**ssA**) permite a identificação presuntiva de estreptococos pertencentes ao grupo A, com base na sensibilidade à bacitracina e na beta-hemólise, no prazo de 24 h após a inoculação com a amostra quando o meio é incubado numa atmosfera enriquecida com CO₂.¹

A placa dividida em duas metades, com o ágar de sangue não selectivo (TSA II) no sector marcado com "I" e com o ágar de sangue selectivo (**ssA**) no sector marcado com "II" permitem o isolamento de estreptococos do grupo A e a avaliação da totalidade de espécies presente na amostra com apenas uma placa.

VI PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

A combinação da caseína com as peptonas de soja na base **BD BBL Trypticase Soy Agar** torna o meio altamente nutritivo através do fornecimento de nitrogénio orgânico. O cloreto de sódio mantém um equilíbrio osmótico.

O sangue ovino desfibrinado permite as reacções hemolíticas características dos estreptococos. Além disso, é inibido o crescimento de *Haemophilus haemolyticus*, um agente não patogénico cujas colónias hemolíticas não se conseguem distinguir das colónias de estreptococos beta-hemolíticos.

O **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II)** permite um excelente crescimento e a beta-hemólise pelo *Streptococcus pyogenes* (grupo A de Lancefield), permitindo igualmente um excelente crescimento e reacções hemolíticas apropriadas com outros microrganismos exigentes. É adequado para utilização com discos de bacitracina com baixa concentração (0,04 unidades) (**BD BBL Taxo A**), para identificação presuntiva de estreptococos do grupo A (*S. pyogenes*).

O **BD BBL Group A Selective Strep Agar with 5% Sheep Blood (ssA)** incorpora uma combinação única de ingredientes selectivos do **BD BBL Trypticase Soy Sheep Blood Agar (TSA II)** para suprimir a flora normal existente na garganta, de modo a melhorar a recuperação de *S. pyogenes*. O sangue ovino desfibrinado fornece enriquecimento para o desenvolvimento destes microrganismos de crescimento lento e permite a detecção da beta-hemólise típica do *S. pyogenes*. Os estreptococos beta-hemolíticos que apresentem uma zona de inibição em volta de um disco de bacitracina (0,04 unidades) podem ser presumivelmente identificados como estreptococos pertencentes ao grupo A.

VII REAGENTES

BD BBL Group A Selective Strep Agar with 5% Sheep Blood (ssA)		BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II)	
Fórmula* aproximada por litro de água purificada		Fórmula* aproximada por litro de água purificada	
Hidrolisado pancreático de caseína	14,5 g	Hidrolisado pancreático de caseína	14,5 g
Hidrolisado papaínico de farinha de soja	5,0 g	Hidrolisado papaínico de farinha de soja	5,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g	Cloreto de sódio	5,0 g
Ágar	14,0 g	Ágar	14,0 g
Factores de crescimento	1,5 g	Factores de crescimento	1,5 g
Agentes selectivos	40,2 mg	Sangue ovino desfibrinado	5%
Sangue ovino, desfibrinado	5%		

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

Advertências e Precauções

Para diagnóstico *in vitro*.

Caso seja observada humidade excessiva, deve inverter a parte inferior da placa sobre uma tampa inclinada e deixar secar ao ar para evitar a formação de um selo entre a parte superior e a parte inferior da placa durante a incubação.

Nas amostras podem existir microrganismos patogénicos, incluindo os vírus das hepatites e o vírus da imunodeficiência humana. No manuseamento de todos os itens contaminados com sangue e outros fluidos corporais, devem ser seguidas as "Precauções padrão"²⁻⁵ e as linhas de orientação da instituição. Após a utilização e antes de serem eliminados, as placas preparadas, os recipientes de amostras e outros materiais contaminados devem ser esterilizados em autoclave.

Instruções de armazenamento

Após a recepção, armazenar as placas em local escuro entre 2 e 8°C. Evitar congelar ou aquecer excessivamente. Abrir apenas quando estiver pronto a utilizar. Minimizar a exposição à luz. As placas preparadas que sejam armazenadas no seu invólucro inicial, entre 2 e 8°C, até ao momento imediatamente anterior à sua utilização, podem ser inoculadas até ao fim do prazo de validade e incubadas durante os períodos de incubação recomendados. Antes da inoculação, deixar o meio aquecer até à temperatura ambiente.

Deterioração do produto

Não utilize placas que apresentem sinais de contaminação microbiana, descoloração, secagem ou outros sinais de deterioração.

VIII COLHEITA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

Podem obter-se amostras adequadas provenientes da garganta passando uma zaragatoa com ponta de poliéster ou poliuretano na área da faringe e das amígdalas, procurando não tocar na língua nem na úvula. (Nota: se as zaragatoas também forem utilizadas com testes directos de detecção de antigénio, é necessária a utilização de zaragatoas de poliéster, seda sintética ou poliuretano com hastes de plástico, p. ex., **BD BBL CultureSwab** e **BD BBL CultureSwab EZ Collection and Transport Systems**.) As culturas de outras fontes que não a garganta devem ser feitas de acordo com os procedimentos recomendados. Para informações mais pormenorizadas, devem consultar-se textos apropriados.^{6,7}

IX PROCEDIMENTO

Material Fornecido

BD BBL Group A Selective Strep Agar with 5% Sheep Blood (ssA) e **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II) - Bi-Plate**.

Material Necessário Mas Não Fornecido

Meios de cultura auxiliares, reagentes, microrganismos de controlo da qualidade e equipamento laboratorial, conforme necessário.

Procedimento do teste

A superfície do ágar deve estar lisa e húmida, mas sem humidade excessiva.

Semeie a amostra, fazendo riscas sobre o ágar, o mais rapidamente possível após a recepção no laboratório. A placa para cultura é usada principalmente para isolar culturas puras provenientes de amostras que contêm flora mista. Em alternativa, se o material for cultivado directamente a partir de uma zaragatoa, rode a zaragatoa sobre uma pequena área da superfície no bordo da placa; em seguida, faça riscas a partir desta área inoculada. Sem reesterilizar a ansa, perfure duas ou três vezes o ágar nas áreas com inoculação mais concentrada.

Quando utilizar esta placa com a mesma amostra, inocule primeiro o lado TSA II, marcado com "I". Em seguida, inocule o lado **ssA**, marcado com "II", e coloque um disco **BD BBL Taxo A** na área que foi perfurada desse lado, ou seja, no ponto em que área perfurada se cruza com a área de sementeira inicial, feita com riscas com a ansa.

Incube as placas inoculadas a uma temperatura de 35 ± 2°C numa atmosfera enriquecida com dióxido de carbono. Se as placas forem incubadas sem dióxido de carbono, as zonas beta-hemolíticas e o tamanho das colónias serão mais reduzidos e será visível um menor número de colónias.

Examine as placas após 18 a 24 h.

Controlo de qualidade pelo utilizador

Os requisitos do controlo de qualidade devem ser efectuados de acordo com os regulamentos ou requisitos de acreditação europeus e/ou nacionais aplicáveis e com os procedimentos padrão de controlo de qualidade do seu laboratório. É recomendado que o utilizador consulte as normas do CLSI e os regulamentos da CLIA que dizem respeito a este assunto, para obter orientações sobre as práticas de controlo de qualidade apropriadas.

X RESULTADOS

Após 18 a 24 h de incubação numa atmosfera enriquecida com dióxido de carbono, os estreptococos pertencentes ao grupo A (*S. pyogenes*) em **ssA** aparecerão como colónias pequenas, translúcidas ou opacas, de cor branca a cinzenta (1 a 2 mm) circundadas por uma zona de beta-hemólise. É normal que se verifique um decréscimo no tamanho relativamente ao controlo não selectivo, **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood**. Podem desenvolver-se colónias diminutas ou muito pequenas de estreptococos alfa-hemolíticos, não hemolíticos ou outros beta-hemolíticos em quantidades reduzidas, mas não devem interferir com a recuperação dos estreptococos pertencentes ao grupo A ou com a interpretação dos resultados. No meio **ssA** são inibidas espécies de *Neisseria*, estreptococos do género *S. viridans*, estafilococos, bastonetes Gram-negativos e a maioria dos estreptococos beta-hemolíticos que não os pertencentes aos grupos A e B. A sensibilidade à bacitracina pode ser utilizada para diferenciar os estreptococos pertencentes ao grupo A dos pertencentes ao grupo B. Um crescimento razoável a elevado de colónias beta-hemolíticas apresentando uma zona de inibição em redor do disco **BD BBL Taxo A** pode ser presumivelmente apresentada como *S. pyogenes*. Também se pode realizar um teste PYR (ácido piroglutâmico). É mais específico e possui a mesma sensibilidade que o teste da bacitracina para este efeito.⁷ Devem fazer-se colorações Gram, que devem ser examinadas.

Pode realizar-se um procedimento de teste do grupo serológico se estiver presente um número suficiente de colónias beta-hemolíticas bem isoladas.

XI LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Uma vez que não existe nenhum meio que seja perfeito, poder-se-ão encontrar algumas estirpes de estreptococos do grupo A (*S. pyogenes*) que se desenvolvam inadequadamente no meio **ssA**; a natureza das amostras e o estado fisiológico dos microrganismos pode influenciar o isolamento das espécies pretendidas e modificar os efeitos característicos inibitórios do meio. É, portanto, útil comparar o crescimento em ambos os lados da placa dividida para obter informações adicionais e para garantir a optimização do isolamento de potenciais agentes patogénicos.

Este meio em placa preparado destina-se ao isolamento primário. Alguns testes de diagnóstico podem ser executados com a placa primária. Contudo, é recomendada uma cultura pura para os testes bioquímicos e procedimentos serológicos. Consulte os textos apropriados para obtenção de informações detalhadas e procedimentos recomendados.⁶⁻⁸

XII CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

Numa avaliação clínica composta por 460 culturas de garganta, houve um total de 117 casos positivos no que se refere a estreptococos do grupo A (*S. pyogenes*) no **BD BBL** Group A Selective Strep Agar with 5% Sheep Blood (**ssA**) relativamente a 100 no SXT Sheep Blood Agar (Ágar de sangue ovino SXT) e 84 no **BD BBL Trypticase** Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II). Destas culturas positivas, 103 foram identificadas com base na beta-hemólise e na sensibilidade à bacitracina (0,04 unidades) no prazo de 24 h no meio **ssA** relativamente a 80 no meio SXT e a apenas 32 no controlo de ágar de sangue TSA não selectivo.⁹

XIII APRESENTAÇÃO

N.º de cat. Descrição

221783 **BD BBL** Group A Selective Strep Agar with 5% Sheep Blood (**ssA**) // **BD BBL Trypticase** Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II), embalagem de 20 placas divididas em duas

XIV BIBLIOGRAFIA

1. Evans, G.L., and T.E. O'Neill. 1984. Development of an improved selective medium for the isolation of group A streptococci from throat cultures, abstr. C-136, p. 259. Abstr. 84th Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. 1984.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa.
3. Garner, J.S. 1996. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee, U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Guideline for isolation precautions in hospitals. Infect. Control Hospital Epidemiol. 17:53–80.
4. U.S. Department of Health and Human Services. 1999. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, HHS Publication (CDC), 4th ed. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
5. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work (seventh individual directive within the meaning of Article 16(1) of Directive 89/391/EEC). Official Journal L262, 17/10/2000, p. 0021–0045.
6. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
7. Ruoff, K.L., R.A. Whaley, and D. Beighton. 1999. Streptococcus, p. 283–296. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
8. Koneman, E.W., S.D. Allen, W.M. Janda, P.C. Schreckenberger, and W.C. Winn, Jr. 1997. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 5th ed. J.B. Lippincott Co., Philadelphia.
9. Carlson, J.R., W.G. Merz, B.E. Hansen, S. Ruth, and D.G. Moore. 1985. Improved recovery of group A beta-hemolytic streptococci with a new selective medium. J. Clin. Microbiol. 21:307–309.

Assistência Técnica e Suporte: contacte o representante local da BD ou visite www.bd.com.

 Becton, Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, MD 21152 USA

 Benex Limited
Pottery Road, Dun Laoghaire
Co. Dublin, Ireland

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.

© 2017 BD. BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.