



BBL Campylobacter Thioglycollate Medium with 5 Antimicrobics



L007445 • Rev. 11 • Abril 2015

PROCEDIMENTOS DE CONTROLO DE QUALIDADE

I INTRODUÇÃO

O Campylobacter Thioglycollate Medium with 5 Antimicrobics (Campy Thio) é um meio de conservação para amostras suspeitas de conterem *Campylobacter jejuni* subespécie *jejuni* antes da inoculação em meio sólido.

II PROCEDIMENTO DO TESTE DE DESEMPENHO

A. TESTE 1: *Campylobacter jejuni* subespécie *jejuni*

1. A partir de uma cultura de *C. jejuni* subespécie *jejuni*, com 24 a 48 h, em **Trypticase** Soy Agar com sangue ovino a 5% (TSA II), prepare um padrão n.º 1 da escala de McFarland.
2. Dilua a cultura padronizada em **Trypticase** Soy Broth para uma concentração de 10^{-3} .
3. Inocule um tubo de Campy Thio com 0,1 mL da cultura diluída. Misture no agitador de vórtice.
4. A partir do tubo Campy Thio inoculado, inocule de imediato uma placa de TSA II (utilize uma zaragatoa para fazer riscas sobre o ágar). Identifique a placa com "pré-refrigeração". Incube a placa a $42 \pm 2^{\circ}\text{C}$ num frasco **GasPak** activado com um invólucro **CampyPak** ou utilize o Sistema **GasPak** EZ Campy. Leia após 36 a 48 h, verificando qual o nível de crescimento do *C. jejuni* subespécie *jejuni*.
5. Refrigere imediatamente os tubos Campy Thio inoculados dum dia para o outro (16 a 24 h), entre 2 e 8°C . NÃO UTILIZE o frasco ou o invólucro **CampyPak**.
6. Após este período de refrigeração, efectue a repicagem do tubo Campy Thio inoculado. Utilize uma zaragatoa para fazer riscas sobre uma placa de TSA II. Identifique a placa com "pós-refrigeração".
7. Incube a placa a $42 \pm 2^{\circ}\text{C}$ num frasco **GasPak** activado com um invólucro **CampyPak** ou utilize o Sistema **GasPak** EZ Campy.
8. Leia a placa após 36 a 48 h, verificando o nível de crescimento.

B. TESTE 2: Flora mista

1. Prepare um padrão n.º 1 de McFarland a partir de uma cultura com flora mista com 18 a 24 h (consistindo numa mistura 1:1:1 de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*).
2. Prepare diluições de 10^{-4} e 10^{-5} a partir da flora mista padronizada.
3. Utilizando a diluição de 10^{-5} , espalhe 0,1 mL de inóculo sobre uma placa de TSA II.
4. a. Utilizando a diluição de 10^{-4} , inocule um tubo de Campy Thio com 0,1 mL. Misture no agitador de vórtice.
b. Inocule imediatamente uma placa de Ágar para Campylobacter com 5 antimicrobianos e sangue ovino a 10% (Campy-BAP) e uma placa de TSA II, com 0,1 mL do tubo de Campy Thio inoculado e espalhe uniformemente com uma espátula de vidro estéril. Identifique as placas com "pré-refrigeração".
5. Incube as placas a $42 \pm 2^{\circ}\text{C}$ num frasco **GasPak** activado com um invólucro **CampyPak** ou utilize o Sistema **GasPak** EZ Campy. Leia após 36 a 48 h, verificando o nível de crescimento.
6. Refrigere imediatamente o tubo Campy Thio dum dia para o outro (16 a 24 h), entre 2 e 8°C . NÃO UTILIZE o frasco ou o invólucro **CampyPak**.
7. Após este período de refrigeração, efectue a repicagem introduzindo a ponta de uma pipeta até cerca de 2 cm abaixo da superfície do Campy Thio e recolhendo continuamente a amostra, à medida que a ponta é retirada lentamente até à superfície. Utilizando uma espátula de vidro estéril, espalhe 0,1 mL de inóculo sobre uma placa de Campy-BAP e uma placa de TSA II. Identifique a placa com "pós-refrigeração".

8. Incube as placas a $42 \pm 2^\circ\text{C}$ num frasco **GasPak** activado com um invólucro **CampyPak** ou utilize o Sistema **GasPak EZ Campy**.
9. Leia as placas após 36 a 48 h, verificando o nível de crescimento.

C. Resultados esperados

Campylobacter jejuni subespécie *jejuni* *ATCC 33291 O isolamento das amostras na placa de TSA II "pós-refrigeração" não deve ser inferior a mais do que um grau de crescimento em relação à amostra "pré-refrigeração".

Flora mista consistindo numa mistura 1:1:1 de:

**Escherichia coli* ATCC 25922 A flora mista deve ser inibida (parcial ou completamente) na placa Campy-BAP. O crescimento (contagens) da cultura mista (10^4) na placa TSA II a partir do tubo Campy Thio deve ser reduzido em comparação com o crescimento (contagens) da cultura mista (10^5) em TSA II a partir do tubo de diluição.

**Enterococcus faecalis* ATCC 29212

**Candida albicans* ATCC 10231

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

III CONTROLO DE QUALIDADE ADICIONAL

1. Examine os tubos, conforme descrito na secção "Deterioração do produto".
2. Examine visualmente os tubos representativos, para assegurar que eventuais defeitos físicos não irão interferir com a utilização.
3. Incube os tubos representativos não inoculados entre 20 a 25°C e 30 a 35°C , e examine-os após 7 dias, verificando se existe contaminação microbiana.

INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO

IV UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O *Campylobacter* Thioglycollate Medium with 5 Antimicrobics (Meio de Tioglicolato para *Campylobacter* com 5 Antimicrobianos) é recomendado como um meio de conservação para amostras suspeitas de conterem *Campylobacter jejuni* subespécie *jejuni*, quando a inoculação em Ágar para *Campylobacter* com 5 antimicrobianos e sangue ovino a 10% não puder ser efectuada de imediato.

V RESUMO E EXPLICAÇÃO

Em 1972, Dekeyser *et al.* referiram o isolamento de *C. jejuni* a partir das fezes de doentes com diarreia e gastroenterite aguda, utilizando uma técnica de filtração e um meio selectivo com antimicrobianos para suprimir a flora entérica.¹ Em 1977, Skirrow descreveu um meio de cultura selectivo com três antimicrobianos.² Blaser *et al.* referiram o isolamento bem sucedido de *C. jejuni* através da inoculação directa de amostras de fezes num meio de ágar com quatro antimicrobianos e através da inoculação deste meio com zaragatoas com fezes refrigeradas em meio líquido de tioglicolato (ágar a 0,16%) com os mesmos quatro antibióticos durante 8 h.^{3,4} Um quinto antimicrobiano, a cefalotina, foi incorporado mais tarde para inibir o crescimento do agente não patogénico *C. fetus* subespécie *fetus*.⁴

O *Campylobacter* Thioglycollate Medium tem sido recomendado como meio de conservação quando não estiverem imediatamente disponíveis instalações para inoculação (fazendo riscos sobre a placa) e incubação, quando for esperado um número reduzido de microrganismos devido a atraso no transporte para o laboratório ou devido ao facto de o estadio agudo da doença já ter terminado.^{5,6}

Para uma revisão do estado taxonómico actual, consulte Nachamkin.⁶

VI PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O Meio de tioglicolato para *Campylobacter* é um meio de conservação selectivo recomendado para isolamento de *C. jejuni* subespécie *jejuni* a partir de amostras clínicas. A incorporação de agentes antimicrobianos, ou seja, anfotericina B, cefalotina, polimixina B, trimetoprim e vancomicina, e a refrigeração inibe a multiplicação posterior da flora microbiana normal em amostras fecais, facilitando assim o isolamento de *C. jejuni* subespécie *jejuni*.

VII REAGENTES

Campylobacter Thioglycollate Medium with 5 Antimicrobics

Fórmula* aproximada por litro de água purificada

Digerido pancreático de caseína	17,0	g
Digerido de soja por papaína	3,0	g
Dextrose	6,0	g
Cloreto de sódio	2,5	g
Tioglicolato de sódio	0,5	g
Ágar	1,6	g
L-cistina	0,25	g
Sulfito de sódio	0,1	g
Anfotericina B	2,0	mg
Cefalotina	15,0	mg
Trimetoprim	5,0	mg
Vancomicina	10,0	mg
Polimixina B	2500,0	unidades

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

Advertências e Precauções

Para diagnóstico *in vitro*.

Os tubos com tampas apertadas devem ser abertos com cuidado, para evitar lesões devido a quebra do vidro.

Nas amostras podem existir microorganismos 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"⁷⁻¹⁰ e as linhas de orientação da instituição. Antes de serem eliminados, esterilizar em autoclave os tubos preparados, os recipientes de amostras e outros materiais contaminados.

Instruções de armazenamento

Após a receção, armazenar os tubos 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. Os tubos com meio que forem armazenados conforme indicado no rótulo até ao momento imediatamente anterior à sua utilização, podem ser inoculados até ao fim do prazo de validade e incubados durante os períodos de incubação recomendados.

Deterioração do produto

Não utilizar tubos que apresentem sinais de contaminação microbiana, descoloração, secagem ou outros sinais de deterioração.

VIII COLHEITA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

As amostras adequadas para cultura podem ser preparadas utilizando várias técnicas. Para obter informações pormenorizadas, consulte os textos apropriados.^{11,12} As amostras devem ser obtidas antes de serem administrados agentes antimicrobianos. Devem tomar-se as providências necessárias para a entrega imediata no laboratório.

IX PROCEDIMENTO

Material fornecido

Campylobacter Thioglycollate Medium with 5 Antimicrobics

Material necessário mas não fornecido

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

Procedimento do teste

Utilize técnicas assépticas.

1. Colheita, conservação e repicagem da amostra para meio em placa.¹³

Introduza uma zaragatoa rectal cerca de 1 cm no interior do meio e rode-a. Retire a zaragatoa ou desça-a até ao fundo do tubo e parta a haste da zaragatoa ao nível do bordo do tubo, para facilitar o acesso à haste.

Com fezes sólidas, prepare uma suspensão salina, misture-a num misturador mecânico (por exemplo, agitador de vórtice) e coloque cinco gotas no meio, a cerca de 1 cm abaixo da

superfície. Em alternativa, percorra toda a área das fezes com uma zaragatoa e inocule o meio tal como foi descrito para uma zaragatoa rectal.

Com fezes diarreicas, coloque cinco gotas no meio, a cerca de 1 cm abaixo da superfície.

Refrigere o Meio de tioglicolato para *Campylobacter* dum dia para outro; no dia seguinte, efectue a repicagem para o Ágar para *Campylobacter* com 5 antimicrobianos e sangue ovino a 10%, inserindo uma pipeta de Pasteur a cerca de 2 cm abaixo da superfície do meio líquido para colher, de forma contínua, uma amostra à medida que a ponta é lentamente retirada para a superfície. Não efectue a repicagem para meios não selectivos, uma vez que ainda poderá existir viabilidade da flora normal.

2. Incubação do meio em placa.

Incube o meio em placa a 42°C numa atmosfera com elevado teor de dióxido de carbono e baixo teor de oxigénio. Esta atmosfera pode ser conseguida utilizando um invólucro produtor de gás descartável **BBL CampyPak** num frasco **GasPak** 100, três invólucros num frasco **GasPak** 150 ou utilizando os sistemas **BBL CampyPouch**, **Bio-Bag** Tipo Cfj ou **GasPak** EZ Campy. Em alternativa, poderá utilizar a evacuação de frascos **GasPak** ventilados e a substituição com gases de cilindro⁶ ou utilizando o princípio de Fortner.¹⁴

Controlo de qualidade pelo utilizador

Consulte "Procedimentos do controlo de qualidade".

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 práticas de controlo de qualidade apropriadas.

X RESULTADOS

As placas de Ágar de *Campylobacter* com 5 antimicrobianos e sangue ovino a 10% inoculadas a partir do *Campylobacter* Thioglycollate Medium with 5 Antimicrobics devem ser examinadas, verificando se existem colónias de *Campylobacter jejuni* subespécie *jejuni*. Estas colónias aparecerão como colónias pequenas e mucóides, normalmente de cor acinzentada, planas com bordos irregulares e não hemolíticas, após um período de 24 a 48 h.¹⁵

As colónias aparecerão apenas ligeiramente visíveis após 18 a 24 h. Existe outra morfologia das colónias, que parece estar relacionadas com a estirpe, constituída por colónias circulares com 1 a 2 mm de diâmetro, convexas, regulares e brilhantes.¹⁵ Uma pequena percentagem de estirpes pode apresentar uma coloração castanho-amarelada ou ligeiramente rosada.¹³

As colónias tendem a espalhar-se ou a crescer em grande número, especialmente quando forem inicialmente isoladas a partir de amostras clínicas recentes. Nota: Se desejar examinar as placas após 24 h de incubação, trate-as como se fossem culturas anaeróbias, ou seja, examine as placas e volte a colocá-las rapidamente na atmosfera com teor reduzido de oxigénio, imediatamente depois de as ter examinado.

XI LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Para a identificação, os microrganismos devem ser uma cultura pura. Para uma identificação final, devem ser efectuados testes morfológicos, bioquímicos e/ou serológicos. Para obter informações pormenorizadas e sobre os procedimentos recomendados, consulte os textos apropriados.^{11,12,16}

XII CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

Foi referido que o rendimento obtido com a utilização do Ágar de sangue para *Campylobacter* e do Meio de tioglicolato para *Campylobacter*, ambos com cinco antimicrobianos, é 33% mais elevado do que quando é utilizado apenas o meio em placa e 28% mais elevado do que quando é utilizado apenas o meio líquido.⁴ Luechtefeld *et al.* referiram que o número de positivos não era aumentado de forma substancial pela conservação de amostras fecais de peru a 4°C, dum dia para outro, em Meio de tioglicolato para *Campylobacter*.¹⁷

XIII APRESENTAÇÃO

N.º de cat.	Descrição
221747	BD BBL Campylobacter Thioglycollate Medium with 5 Antimicrobics, emb. com 10 tubos K
221748	BD BBL Campylobacter Thioglycollate Medium with 5 Antimicrobics, caixa com 100 tubos K

XIV BIBLIOGRAFIA

1. Dekeyser, P., M. Gossuin-Detrain, J.P. Butzler, and J. Sternon. 1972. Acute enteritis due to related *Vibrio*: first positive stool cultures. *J. Infect. Dis.* 125:390-392.
2. Skirrow, M.B. 1977. *Campylobacter* enteritis: a "new" disease. *Br. Med. J.* 2:9-11.
3. Blaser, M., J. Cravens, B.W. Powers, and W.L. Wang. 1978. *Campylobacter* enteritis associated with canine infection. *Lancet* 2:979-980.
4. Blaser, M.J., V. Berkowitz, F.M. LaForce, J. Cravens, L.B. Reller, and W.-L.L. Wang. 1979. *Campylobacter* enteritis: clinical and epidemiologic features. *Ann. Intern. Med.* 91:179-185.
5. Reller, L.B., W.-L.L. Wang, and M.J. Blaser. 1979. *Campylobacter* enteritis: *Campylobacter fetus* subspecies *jejuni*. *ASCP Check Sample, Microbiology No. MB-99*, Commission on Continuing Education, American Society of Clinical Pathologists, Chicago.
6. Nachamkin, I. 1999. *Campylobacter* and *Archobacter*, p. 716-726. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Murray, P.R., E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, and R.H. Tenover (ed.). 2003. *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
12. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
13. Kaplan, R.L. 1980. *Campylobacter*, p. 235-241. In E.H. Lennette, A. Balows, W.J. Hausler, Jr., and J.P. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 3rd ed. American Society of Microbiology, Washington, D.C.
14. Karmali, M.A., and P.C. Fleming. 1979. Application of the Fortner principle to isolation of *Campylobacter* from stools. *J. Clin. Microbiol.* 10:245-247.
15. Smibert, R.M. 1984. Genus *Campylobacter* Sebald and Veron 1963, 907, p. 111-118. In N.R. Krieg, and J.G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore.
16. Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams (ed.). 1994. *Bergey's Manual™ of determinative bacteriology*, 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
17. Luechtefeld, N.W., W.-L.L. Wang, M.J. Blaser, and L.B. Reller. 1981. Evaluation of transport and storage techniques for isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* from turkey fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* 13:438-443.

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

 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.
BD, BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company. © 2015 BD