

PROCEDIMENTOS DE CONTROLO DE QUALIDADE

I INTRODUÇÃO

O **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood** é utilizado para cultura de microrganismos exigentes e para visualização de reacções hemolíticas. O **BD BBL MacConkey II Agar with MUG** é utilizado para a identificação presuntiva de *Escherichia coli*.

II PROCEDIMENTO DO TESTE DE DESEMPENHO

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

- Inocule as amostras representativas com diluições das culturas listadas abaixo.
 - Utilizando uma pipeta volumétrica ou um método equivalente, distribua 0,1 mL de uma diluição com 30 a 300 UFC em cada placa e espalhe o inóculo com uma espátula de vidro estéril.
 - Incube as estirpes de *Staphylococcus* e *Escherichia* a 35 ± 2 °C, numa atmosfera aeróbia, e as estirpes de *Streptococcus* a 35 ± 2 °C, numa atmosfera aeróbia suplementada com dióxido de carbono.
- Examine as placas após 18 a 24 h, verificando a existência de crescimento, o tamanho das colónias e reacções de hemólise.
- Resultados esperados

Microrganismos de controlo do CLSI	(Estirpes 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.

B. **BD BBL MacConkey II Agar with MUG**

- Inocule as amostras representativas com diluições das culturas listadas abaixo.
 - Utilizando diluições de 10^{-1} de culturas em meio líquido com 18 a 24 h, semeie as placas para isolamento, fazendo riscas sobre o ágar. Para o *Proteus mirabilis*, faça mais duas diluições de dez vezes antes de semear.
 - Incube as placas a 35 ± 2 °C numa atmosfera aeróbia.
 - Inclua placas de **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood** como controlos não selectivos para todos os microrganismos.
- Examine as placas após 18 a 48 h, verificando se existe crescimento, fluorescência, pigmentação e selectividade.
- Resultados esperados

Microrganismos	ATCC	Isolamento	Cor das colónias	Fluorescência
* <i>Escherichia coli</i>	25922	Crescimento	Colónias vermelhas rosadas	+
<i>Proteus mirabilis</i>	12453	Crescimento	Colónias incolores, inibição de crescimento excessivo	-
* <i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serotipo Typhimurium	14028	Crescimento	Colónias incolores	-
* <i>Enterococcus faecalis</i>	29212	Inibição (parcial a completa)	N/A	-

*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 $7,4 \pm 0,2$ (TSA II) e $7,1 \pm 0,2$ (**BD BBL MacConkey II Agar with MUG**).
- Durante o procedimento de inoculação, tenha atenção à solidez das placas.
- Incube as placas representativas não inoculadas a 35 ± 2 °C durante 72 h e examine-as, verificando se existe contaminação microbiana.

INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO

IV UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood** (Ágar de soja **BD BBL Trypticase** com sangue ovino a 5%) é utilizado para cultura de microrganismos exigentes e para visualização de reacções hemolíticas produzidas por muitas espécies de bactérias.

O **BD BBL MacConkey II Agar with MUG** é utilizado para a identificação presuntiva de *Escherichia coli*.

V RESUMO E EXPLICAÇÃO

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

A composição nutricional do **BD 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** é largamente utilizado para isolamento e cultura de espécies microbianas exigentes e para determinação de reacções hemolíticas, que são importantes características de diferenciação para as bactérias, especialmente para espécies de *Streptococcus*.

B. BD BBL MacConkey II Agar with MUG

A formulação do **BD BBL MacConkey II Agar** foi disponibilizada em 1983. Foi especialmente concebida para melhorar a inibição do crescimento excessivo de espécies de *Proteus*, para conseguir uma diferenciação mais definitiva entre as bactérias fermentadoras de lactose e as não fermentadoras e para a promoção do crescimento dos agentes patogénicos entéricos.

Trepeta e Edberg¹ modificaram o Ágar **BD BBL MacConkey** incorporando MUG (4-metilumbeliferil-β-D-glicurónido). O meio resultante permitiu aos autores efectuar em 5 min uma identificação presuntiva da *E. coli* a partir do meio em placa primário.

VI PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

A. BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood

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

O sangue ovino desfibrinado é o sangue mais utilizado para enriquecimento de meios com base de ágar.² As reacções hemolíticas dos estreptococos são adequadas e o crescimento de *Haemophilus haemolyticus*, uma bactéria não patogénica cujas colónias hemolíticas não se podem distinguir das dos estreptococos beta-hemolíticos, é inibido.

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 Taxo A**), para identificação presuntiva de estreptococos do grupo A (*S. pyogenes*).

B. BD BBL MacConkey II Agar with MUG

O **BD BBL MacConkey II Agar** é um meio selectivo e diferencial. É apenas ligeiramente selectivo, uma vez que a concentração de sais biliares, que inibe microrganismos Gram-positivos, é baixa em comparação com outros meios em placa entéricos. O violeta de cristal também é incluído no meio para inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas, especialmente enterococos e estafilococos.

A diferenciação de microrganismos entéricos é conseguida pela combinação da lactose com o indicador vermelho neutro. São produzidas colónias incolores ou cor-de-rosa a vermelho, dependendo da capacidade do isolado para fermentar o hidrato de carbono.

A maioria das estirpes (96 a 97%) de *E. coli* produz β-D-glicuronidase.³ A enzima hidrolisa o MUG produzindo 4-metilumbeliferona, um composto que fluoresce sob uma luz UV de elevado comprimento de onda (366 nm). A adição de MUG à formulação permite que as estirpes de *E. coli* β-D-glicuronidase-positivas apresentem uma fluorescência verde azulada quando são examinadas com luz UV.

VII REAGENTES

BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II)

Fórmula* aproximada por litro de água purificada

Hidrolisado pancreático de caseína	14,5 g	Ágar	14,0 g
Hidrolisado papaínico de farinha de soja	5,0 g	Factores de crescimento	1,5 g
Cloreto de sódio	5,0 g	Sangue ovino desfibrinado	5%

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

BD BBL MacConkey II Agar with MUG

Fórmula* aproximada por litro de água purificada

Hidrolisado pancreático de gelatina	17,0 g	Cloreto de sódio	5,0 g
Hidrolisado pancreático de caseína	1,5 g	Vermelho neutro	0,03 g
Hidrolisado péptico de tecidos animais	1,5 g	Violeta de cristal	0,001 g
Lactose	10,0 g	MUG (4-metilumbeliferil-β-D-glucurónido).....	0,1 g
Sais biliares	1,5 g	Ágar	13,5 g

*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"⁴⁻⁷ 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 forem 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

As amostras adequadas para cultura podem ser preparadas utilizando várias técnicas. Para obter informações pormenorizadas, consulte os textos apropriados.^{8,9} 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

BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II) and **BD BBL MacConkey II Agar with MUG (BD I Plate)**

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.

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. Esta placa é utilizada principalmente para isolar culturas puras de amostras que contenham 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; em seguida, faça riscas a partir desta área inoculada.

Incube as placas, protegendo-as da luz, a 35 ± 2 °C durante 18 a 24 h. Com as amostras respiratórias, incube numa atmosfera aeróbia suplementada com dióxido de carbono. Com as outras amostras, incube em atmosfera aeróbia *sem* adicionar CO₂.

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 práticas de controlo de qualidade apropriadas.

X RESULTADOS

Após a incubação, a maioria das placas mostrará uma área de crescimento confluyente. Devido ao facto de o procedimento de sementeira com riscas sobre o ágar ser, na realidade, uma técnica de "diluição", é depositado um número decrescente de microrganismos nas áreas com riscas. Consequentemente, uma ou mais destas áreas deve exibir colónias isoladas dos microrganismos presentes na amostra. Mais ainda, o crescimento de cada um dos microrganismos poderá ser avaliado de forma semi-quantitativa com base no crescimento de cada uma das áreas com riscas.

Os resultados típicos em **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood** são os seguintes:

- Os estreptococos hemolíticos podem aparecer como colónias translúcidas ou opacas, acinzentadas, pequenas (1 mm), ou como colónias grandes (2 a 4 mm) mate e mucóides, envolvidas por uma área de hemólise. Deve proceder-se à coloração Gram e ao respectivo exame, para confirmação dos achados macroscópicos. (Outros microrganismos que podem causar hemólise incluem espécies de *Listeria*, várias corinebactérias, estafilococos hemolíticos, a *Escherichia coli* e *Pseudomonas*.)
Na apresentação dos resultados, a quantificação aproximada do número de colónias de estreptococos hemolíticos pode ser útil para o médico.
- Os pneumococos aparecem normalmente como colónias planas, lisas, translúcidas, acinzentadas e, por vezes, mucóides, rodeadas por uma área estreita de hemólise "verde" (alfa).
- Os estafilococos aparecem como colónias opacas, de cor branca a amarelo-dourado, com ou sem áreas de beta-hemólise.
- Listeria*. São produzidas pequenas áreas de beta-hemólise. Podem ser distinguidas pela forma de bastonetes nas colorações e pela motilidade à temperatura ambiente.
- Nesta formulação não selectiva, podem igualmente ser esperados outros microrganismos que representam uma flora mínima e isolados clinicamente significativos.

A morfologia de colónias típica em **BD BBL MacConkey II Agar with MUG** é a seguinte:

As colónias de bactérias fermentadoras de lactose apresentam uma cor rosa a vermelha rosada e poderão estar rodeadas por uma zona de bilis precipitada, enquanto que as colónias não fermentadoras de lactose são incolores. Sob luz UV com comprimento de onda elevado (366 nm), examine o meio. As colónias β-D-glucuronidase positivas exibem uma fluorescência verde azulada; as colónias β-D-glucuronidase negativas não exibem fluorescência.

XI LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Foi referido que algumas Enterobacteriaceae e a *Pseudomonas aeruginosa* são inibidas pelo **BD BBL MacConkey Agar** quando incubadas numa atmosfera enriquecida com CO₂.¹⁰

Nem todas as estirpes de *E. coli* fermentam a lactose ou produzem β-D-glicuronidase. Algumas estirpes de *Salmonella* e *Shigella* produzem β-D-glicuronidase e apresentarão fluorescência.¹⁰ Foi observada fluorescência numa pequena percentagem de espécies de *Yersinia* e estreptococos.¹²

Para serem identificados, os organismos têm que estar numa cultura pura. Devem realizar-se testes morfológicos, bioquímicos e/ou serológicos para uma identificação final. Para obter informações pormenorizadas e sobre os procedimentos recomendados, consulte os textos apropriados.^{8,9,13}

XII CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood

O **BD BBL Trypticase Soy Agar (TSA)** with 5% Sheep Blood foi usado como controlo num estudo que utilizou uma cultura otimizada em meio líquido (Todd Hewitt) e o método de Imunoensaio Óptico, para diagnóstico da infecção por estreptococos β-hemolíticos. Foram testadas quinhentas e duas (502) amostras. O TSA with 5% Sheep Blood teve uma sensibilidade e uma especificidade de 92,5% e 99,4%, respectivamente.¹⁴ Nguyen et al. utilizaram **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood** como "referência" para a detecção de *Streptococcus* do grupo B no tracto genital inferior de mulheres grávidas.¹⁵ Noutro estudo, Rossmann et al. isolaram com sucesso *Lautropia mirabilis* em **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood**, a partir das cavidades orais de crianças infectadas com o vírus da imunodeficiência.¹⁶ Das 85 crianças avaliadas neste estudo, 35 (41,4%) foram positivas para *L. mirabilis*. Isenberg et al. utilizaram **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood** como um controlo para avaliar o isolamento de *Enterococcus* a partir do meio selectivo em estudo.¹⁷ Foram utilizadas duzentas e cinquenta (250) estirpes de estreptococos do grupo D, a partir de material clínico, e 8 estirpes obtidas a partir do National Communicable Disease Center (Atlanta).

BD BBL MacConkey II Agar with MUG

Num estudo clínico realizado num hospital e numa Faculdade de Medicina, o MUG foi incorporado em **BD BBL MacConkey II Agar** para detectar a presença de β -glicuronidase. Este estudo concluiu que o tempo para a identificação de estirpes de *E. coli* foi reduzido de uma hora para cinco minutos, e que a capacidade de identificação deste microrganismo em amostras mistas foi melhorada.¹

XIII APRESENTAÇÃO

N.º de cat.	Descrição
221949	BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II) e BD BBL MacConkey II Agar with MUG – BD I Plate

XIV BIBLIOGRAFIA

1. Trepeta, R.W., and S.C. Edberg. 1984. Methylumbelliferyl- β -D-glucuronide-based medium for rapid isolation and identification of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 19:172-174.
2. Vera, H.D., and D.A. Power. 1980. Culture media, p. 969. In E.H. Lennette, A. Balows, W.J. Hausler, Jr., and J.P. Truant (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 3rd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
3. Killian, M., and P. Bulow. 1976. Rapid diagnosis of *Enterobacteriaceae*. I Detection of bacterial glycosidases. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sec. B*, 84:245-251.
4. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Murray, P.R., E.J. Baron, J.H. Tenover, and R.H. Tenover (ed.). 2003. *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
9. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
10. Mazura-Reetz, G., T.R. Neblett, and J.M. Galperin. 1979. MacConkey agar: CO₂ vs. ambient incubation, abstr. C 179, p. 339. *Abstr. 79th Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol.* 1979.
11. Feng, P.C.S., and P.A. Hartman. 1982. Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:1320-1329.
12. Robison, B.J. 1984. Evaluation of a fluorogenic assay for detection of *Escherichia coli* in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:285-288.
13. 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.
14. Fries, S.M. 1995. Diagnosis of group A streptococcal pharyngitis in a private clinic: comparative evaluation of an optical immunoassay method and culture. *J. Pediatr.* 126:933-936.
15. Nguyen, T.M., et al. 1998. Detection of group B streptococcus: comparison of an optical immunoassay with direct plating and broth-enhanced culture methods. *J. Matern. Fetal. Med.* 7:172-176.
16. Rossmann, S.N. et al. 1998. Isolation of *Lautropia mirabilis* from oral cavities of human immunodeficiency virus-infected children. *J. Clin. Microbiol.* 36:1756-1760.
17. Isenberg, H.D., D. Goldberg, and J. Sampson, 1970. Laboratory studies with a selective medium. *Appl. Microbiol.* 20: 433-436.

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.