



BD BBL™ CHROMagar™ Staph aureus



UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

BBL CHROMagar Staph aureus consiste num meio selectivo para isolamento, enumeração e identificação *Staphylococcus aureus* de amostras clínicas e alimentares. Os testes de confirmação de isolados típicos de amostras clínicas não são necessários.

BBL CHROMagar Staph aureus (meio em placa preparado) foi validado pelo instituto de investigação AOAC™ de acordo com o programa Performance Tested MethodsSM para a análise de ovos com casca, salmão fumado e carne assada ao utilizar métodos AOAC e ISO.^{1,2} Os testes confirmatórios de colónias de cor malva, obtidos das matrizes alimentares indicadas, são necessários.

PRINCÍPIOS E EXPLICAÇÃO DO PROCEDIMENTO

Método microbiológico.

O *S. aureus* é um agente patogénico bem documentado. É responsável por infecções superficiais a sistémicas.^{3,4} Devido à prevalência deste organismo e das implicações clínicas, a sua detecção é extremamente importante.

A intoxicação alimentar com estafilococos causado pelo *S. aureus* é um dos tipos de intoxicação alimentar mais comuns em todo o mundo. A detecção e enumeração deste organismo ajuda a fornecer informação sobre o potencial risco de saúde nos alimentos, assim como representa um indicador de falta de higiene.⁵ É também recomendada a utilização deste organismo como um indicador da qualidade da água.⁶

O **BBL CHROMagar Staph aureus** destina-se ao isolamento, enumeração e identificação *S. aureus* com base na formação de colónias de cor malva. O adição de substratos cromogénicos ao meio permite a diferenciação do *S. aureus* de outros organismos.

Uma vantagem do **BBL CHROMagar Staph aureus** sobre outros meios tradicionais como, por exemplo, o Baird-Parker Agar, consiste na capacidade de identificação do *S. aureus* em 24 h, em vez de 48 h.

O **BBL CHROMagar Staph aureus** foi desenvolvido originalmente por A. Rambach, CHROMagar, Paris, França. A BD, no âmbito de um acordo de licenciamento, optimizou esta formulação utilizando a propriedade intelectual proprietária usada no fabrico do meio em placa **BBL CHROMagar Staph aureus**. Peptonas Difco™, seleccionadas especialmente para este efeito, fornecem os nutrientes. O adição de agentes selectivos inibe o crescimento de organismos gram-negativo, leveduras e alguns cocos gram-positivo. A mistura de cromogénios é composta por substratos artificiais (cromogénios), que libertam um composto colorido insolúvel quando hidrolisado por enzimas específicas. É assim permitida a detecção e diferenciação do *S. aureus* de outros organismos. O *S. aureus* utiliza um dos substratos cromogénicos e produz colónias de cor malva. O crescimento das colónias de cor malva em 24 h é considerado um positivo para *S. aureus* no **BBL CHROMagar Staph aureus**. As bactérias, não *S. aureus*, podem utilizar outros substratos cromogénicos resultando em colónias de cor azul, azul esverdeado ou, caso não sejam utilizados substratos cromogénicos, colónias de cor natural.

*AS AMOSTRAS FORNECIDAS PELO PRODUTOR DESTES MODELOS DE KIT DE TESTE FORAM AVALIADAS DE FORMA INDEPENDENTE PELO AOAC RESEARCH INSTITUTE, TENDO-SE VERIFICADO QUE O SEU DESEMPENHO ESTÁ DE ACORDO COM AS ESPECIFICAÇÕES DO PRODUTOR CONFORME DECLARADO NO FOLHETO DESCRITIVO DO KIT DE TESTE. O PRODUTOR CERTIFICA QUE ESTE KIT ESTÁ, SOB TODOS OS ASPECTOS, EM CONFORMIDADE COM AS ESPECIFICAÇÕES ORIGINALMENTE AVALIADAS PELO AOAC RESEARCH INSTITUTE, CONFORME DETALHADO EM *Performance Tested MethodsSM*, CERTIFICADO NÚMERO 100503.

REAGENTES

BBL CHROMagar Staph aureus

Fórmula Aproximada* Por Litro de Água Purificada

Cromopeptona	40,0 g
Cloreto de sódio	25,0 g
Mistura cromogénica	0,5 g
Agentes inibidores	0,07 g
Agar	14,0 g

pH: 6.8 +/- 0.2

*Ajustado e/ou suplementado conforme necessário para cumprir os critérios do desempenho.

PRECAUÇÕES

IVD . Apenas para uso profissional. 

Caso seja observada humidade excessiva, deve-se 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. Proteja da luz durante a secagem. Consultar

ARMAZENAMENTO E PRAZO DE VALIDADE

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

Nas amostras podem existir microorganismos patogénicos, incluindo os vírus das hepatites e o vírus da imunodeficiência humana. Na manipulação de todos os itens contaminados com sangue e outros líquidos corporais, devem ser seguidas as Precauções Padrão⁷⁻¹⁰ e as linhas de orientação da instituição.

Utilizar técnicas assépticas e cumprir as precauções estabelecidas contra perigos microbiológicos em todos os procedimentos.

Após a utilização e antes de serem eliminados, as placas preparadas, os recipientes de amostras e outros materiais contaminados devem ser esterilizados em autoclave.

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 receção 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 placas 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.

CONTROLO DE QUALIDADE PELO UTILIZADOR

Verificar o desempenho inoculando uma amostra representativa das placas com culturas puras de microrganismos de controlo estáveis que produzam as reacções conhecidas e desejadas (para pormenores, consultar o documento **INSTRUÇÕES GERAIS DE UTILIZAÇÃO**). Estão recomendadas as estirpes de teste mencionadas no Quadro em baixo. Incubar em condições aeróbias durante 18 a 24 horas, a uma temperatura de 35 ± 2°C num ambiente escuro.

Estirpes	Resultados de crescimento
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Crescimento; colónias malva
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ATCC 15305	Crescimento; colónias verdes a azul-verdes
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	Inibição (parcial a completa)
Não inoculadas	Sem cor a âmbar ligeiro, transparente a turvo ligeiro

Os requisitos de controlo da qualidade têm de ser realizados de acordo com os regulamentos ou as exigências de acreditação aplicáveis locais, estaduais e/ou federais [EUA] e os procedimentos de Controlo da Qualidade em vigor no laboratório. É recomendado que o utilizador consulte as normas relevantes do Clinical and Laboratory Standards Institute (anteriormente NCCLS) sobre as práticas de controlo de qualidade apropriadas.

PROCEDIMENTO

Materiais fornecidos

BBL CHROMagar Staph aureus, fornecido em placas de 90 mm **Stacker**

Material Necessário mas Não Fornecido: Meios de cultura auxiliares, reagentes, microrganismos de controlo da qualidade e outro equipamento laboratorial, conforme necessário.

Tipos de amostra

Consultar a bibliografia ou normas apropriadas para detalhes sobre a colheita da amostra e procedimentos de manuseamento. O meio é utilizado para isolamento do *Staphylococcus aureus* de todos os tipos de amostras clínicas. Consultar também **CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO E LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO**.

Por teste de produtos agroalimentares, seguir os métodos padrão adequados para detalhes sobre a preparação e processamento de amostras, de acordo com o tipo de amostra e sua localização geográfica.

Procedimento do teste

Utilizar técnicas assépticas. A superfície do agar deve estar lisa e húmida, mas sem humidade excessiva. Para amostras clínicas, logo após a receção no laboratório, inocular a amostra numa placa com **BBL CHROMagar Staph aureus** e espalhar para obter o isolamento. Se a amostra estiver a ser cultivada a partir de uma zaragatoa, fazer rolar suavemente a zaragatoa sobre uma pequena área da superfície na extremidade e, em seguida, espalhar a partir desta área com um ansa. Incubar as placas em condições aeróbias, a uma temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante um período de 20 a 24 h em posição invertida (com o lado do agar voltado para cima).

Para amostras alimentares, consultar as referências adequadas e seguir os métodos padrão aplicáveis. Inocular as amostras alimentares homogeneizadas no **BBL CHROMagar Staph aureus** através da técnica de placa espalhada. Incubar as placas em condições aeróbias, a uma temperatura de 35 a 37°C durante um período de 20 a 24 h em posição invertida (com o lado do agar voltado para cima).

Resultados

Após uma incubação correcta, examinar as placas contra um fundo branco. O *S. aureus* irá apresentar colónias malva a malva-laranja no meio **BBL CHROMagar Staph aureus**. A maioria dos organismos gram-positivo, se não forem inibidos, produzirão colónias azuis, azul-esverdeadas ou de cor natural (incolor, branco ou creme). Os organismos gram-negativo e as leveduras são parcial a completamente suprimidos.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO E LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Resultados de desempenho¹²

Testes clínicos:

1. Num ensaio de campo realizado num grande hospital metropolitano dos EUA, foram avaliadas 201 amostras da garganta e de escarro provenientes de pacientes com fibrose cística e 459 amostras nasais provenientes de outros pacientes internados utilizando **BBL CHROMagar Staph aureus**. O **BBL CHROMagar Staph aureus** foi comparado com agar sanguíneo ou agar de sal de manitol, com confirmação do isolado pela coagulase da lâmina. O *S. aureus* foi recolhido de 190 amostras combinadas. O **BBL CHROMagar Staph aureus** detectou 9 culturas adicionais positivas para o *S. aureus* que não foram recolhidas em meios convencionais. Foram também observados quatro potenciais casos de falsos positivos no meio **BBL CHROMagar Staph aureus** após uma incubação de 24 h: duas corinebactérias e dois estafilococos negativos à coagulase. O **BBL CHROMagar Staph aureus** produziu uma sensibilidade geral de 99,5% e uma especificidade de 99,2%.¹¹
2. Num estudo europeu, cento e sessenta e cinco (165) amostras de um laboratório de rotina, constituídas por 100 amostras positivas para *S. aureus* determinadas por métodos convencionais (amostras positivas conhecidas) e 65 amostras negativas

conhecidas, foram riscadas em **BBL CHROMagar Staph aureus**, Agar de Sal de Manitol e Agar de Columbia com 5% de Sangue de Ovelha. Os tipos de amostra constam do Quadro 1. As placas foram incubadas durante 20 a 24 horas entre 35 e 37°C e lidas para colônias suspeitas de *S. aureus*. Foram estabelecidos testes de coagulase em tubo a partir de todas as colônias suspeitas nos três meios. Para além disso, foi determinada a quantidade de crescimento de *S. aureus* (pontuada de forma semi-quantitativa).

Quadro 1: Tipos de amostra

Tipos de amostra	Amostras positivas conhecidas para <i>S. aureus</i>	Amostras negativas conhecidas para <i>S. aureus</i>
Abcessos	14	6
Líquido ascítico	1	0
Osso	1	0
Bursa	1	0
Cateter	4	0
Drenagem	1	0
Fístula	0	1
Amostras de cirurgia	12	15
Compressas várias	12	19
Fleimões	1	0
Secreções traqueais	1	0
Feridas	52	24
Total	100	65

Resultados: Das 165 amostras, 100 produziram crescimento de *S. aureus* em qualquer meio, conforme confirmado por testes de coagulase de todos os meios.

Em **BBL CHROMagar Staph aureus**, 100 amostras produziram crescimento de *S. aureus*; em Agar de Sal de Manitol, 91 produziram *S. aureus*; em Agar de Columbia juntamente com teste de coagulase, 98 amostras foram positivas para *S. aureus*.

Registou-se um falso positivo em **BBL CHROMagar Staph aureus**, que revelou ser *Streptococcus agalactiae*. Após repetição dos riscos da estirpe em **BBL CHROMagar Staph aureus**, as colônias apresentaram cor violeta, em vez de rosa a malva.

Entre as amostras negativas conhecidas, foram observadas 5 culturas com colônias violeta ou lilás, semelhantes na cor ao *S. aureus*. Todavia, foram facilmente diferenciadas das colônias de *S. aureus* (= rosa a malva) pelo leitor, que não estava muito familiarizado com as cores das colônias das várias espécies que crescem no meio (antes do início do estudo, só lhe tinha sido facultado um resumo das cores e microrganismos ocorrendo no meio).

As sensibilidades de **BBL CHROMagar Staph aureus** (com base na cor da colônia rosa a malva), Agar de Sal de Manitol (com base na cor amarela do meio em redor das colônias) e Agar de Columbia (crescimento de colônias típicas de *S. aureus* em conjunto com o teste da coagulase) foram de 100%, 91%, e 98%. A especificidade de **BBL CHROMagar Staph aureus** foi de 98,5%.

Em **BBL CHROMagar Staph aureus**, a intensidade do crescimento foi, de forma significativa, frequentemente mais elevada do que em MSA ($p = 0,05$); consultar o Quadro 2.

O **BBL CHROMagar Staph aureus** pode ser usado para uma ampla variedade de amostras.

Quadro 2: Intensidade de crescimento de isolados de *S. aureus* em CSA* comparativamente com MSA*

	Intensidade do crescimento					
	CSA = Col	CSA > Col	Col > CSA	CSA = MSA	CSA > MSA	MSA > CSA
Número de amostras	74	12	14	74	18**	8

* CSA, **BBL CHROMagar Staph aureus**; MSA, Agar de Sal de Manitol; Col, Agar de Columbia com 5% de Sangue de Ovelha

** diferença estatisticamente significativa ($p = 0,05$)

Teste de produtos agroalimentares

O **BBL CHROMagar Staph aureus** foi validado pelo instituto de investigação AOAC de acordo com o programa Performance Tested Methods. O meio foi avaliado por um laboratório de referência externo, assim como internamente na BD, relativamente à recolha e enumeração do *S. aureus* em carne assada, salmão fumado e ovos com casca. A recolha e enumeração do *S. aureus* no **BBL CHROMagar Staph aureus** foi comparada com o meio de placa de referência AOAC e ISO, Baird-Parker Agar, com utilização dos diluentes recomendados a níveis baixos, médios e elevados de inóculo de *S. aureus*. Após uma incubação de 24 h, foi realizada a enumeração no **BBL CHROMagar Staph aureus** e após 48 h no Baird-Parker Agar. Com base numa análise estatística, não foi determinada uma diferença significativa entre os métodos de referência e o método **BBL CHROMagar Staph aureus** para qualquer tipo alimentar ou nível de contaminação, com excepção de uma amostra de baixo nível de salmão fumado. O nível baixo de contaminação de salmão fumado demonstrou uma diferença estatística nos testes internos através do método ISO; ou seja, o método **BBL CHROMagar Staph aureus** após 24 h recolheu mais colónias ($\log_{10} = 2,04$) do que a referência ISO após 48 h ($\log_{10} = 1,64$). A estimativa da precisão na repetibilidade do método **BBL CHROMagar Staph aureus** foi satisfatória. Os coeficientes de correlação situaram-se entre 92,6% e 99,4% demonstrando uma boa correlação para todos os níveis de contaminação em todos os tipos alimentares. Os dados estão resumidos nos Quadros 1 e 2. Não foram recolhidas colónias com falso-positivo nas matrizes alimentares através do método **BBL CHROMagar Staph aureus**. Todas as colónias malva foram confirmadas quanto à presença de *S. aureus* sem discrepâncias. Para além disso, 30 estirpes de *S. aureus*, incluindo as estirpes conhecidas produtoras de enterotoxina, e 37 isolados não *S. aureus* foram avaliados, produzindo uma sensibilidade e especificidade de 100% no **BBL CHROMagar Staph aureus**.¹¹

Quadro 1. Resumo dos Testes Externos AOAC e ISO de Carne Assada e Ovos com Casca

		AOAC		
	Nível de inóculo	Teste-t emparelhado ou ANOVA ^a unidireccional	Repetibilidade (desvio padrão) ^b	Quadrado do coeficiente de correlação linear
Carne assada	Baixo	Não significativo	0,398	96,0%
	Médio	Não significativo	0,04	
	Alto	Não significativo	0,062	
Ovos com casca	Baixo	Não significativo	0,302	95,5%
	Médio	Não significativo	0,089	
	Alto	Não significativo	0,143	
		ISO		
	Nível de inóculo	Teste-t emparelhado ou ANOVA ^a unidireccional	Repetibilidade (desvio padrão) ^b	Quadrado do coeficiente de correlação linear ^c
Carne assada	Baixo	Não significativo	0,315	94,6%
	Médio	Não significativo	0,045	
	Alto	Não significativo	0,117	
Ovos com casca	Baixo	Não significativo	0,341	92,6%
	Médio	Não significativo	0,223	
	Alto	Não significativo	0,135	

Consultar notas de rodapé no Quadro 2

Quadro 2. Resumo dos Testes Externos AOAC e ISO e Testes Internos de Salmão Fumado

	Nível de inóculo	Teste-t emparelhado ou ANOVA ^a unidireccional		Repetibilidade (desvio padrão) ^b		Quadrado do coeficiente de correlação linear ^c	
	Baixo	Não significativo	Não significativo	0,132	0,271		

AOAC Salmão fumado	Médio	Não significativo	Não significativo	0,055	0,095	99,4%	93,2%
	Alto	Não significativo	Não significativo	0,064	0,161		
ISO Salmão fumado	Baixo	Não significativo	Significativo ^d	0,158	0,227	98,7%	97,4%
	Médio	Não significativo	Não significativo	0,135	0,165		
	Alto	Não significativo	Não significativo	0,116	0,033		

a Análise de teste-t emparelhado e ANOVA unidireccional utilizada para avaliar o desempenho comparável **BBL CHROMagar Staph aureus** em relação ao meio de referência através da comparação a média log₁₀ para as contagens das colónias.

b A repetibilidade demonstra que o **BBL CHROMagar Staph aureus** produz resultados comparáveis entre testes executados com o mesmo material e método.

c O quadrado do coeficiente de correlação linear é utilizado para avaliar a precisão dos métodos quantitativos em contagens diferentes *S. aureus*.

d O **BBL CHROMagar Staph aureus** recolheu mais colónias do que o método de referência ISO.

Limitações do Procedimento

Ocasionalmente, algumas estirpes de estafilococos, para além do *S. aureus*, por exemplo: *S. cohnii*, *S. intermedius* e *S. schleiferi*, assim como corinebactérias e leveduras, podem produzir colónias de cor malva após 24 h.¹¹ A diferenciação do *S. aureus* de não *S. aureus* pode ser realizada pela coagulase, outros bioquímicos ou coloração Gram. Podem também surgir bacilos gram-negativo resistentes, que surgem geralmente como pequenas colónias azuis.

A incubação para além de 24 h (amostras clínicas) e 28 h (amostras alimentares) não é recomendada devido a um aumento nos potenciais falso positivos. Se o tempo de incubação for excedido, as colónias de cor malva devem ser confirmadas como *S. aureus* antes da emissão do resultado.

Uma incubação de duração inferior às 20 h recomendadas poderá resultar numa percentagem mais baixa de resultados correctos.

Devido ao pigmento dourado natural de algumas estirpes de *S. aureus*, a cor da colónia poderá apresentar-se malva-laranja.

BIBLIOGRAFIA

1. AOAC Official Method 9755.55. *Staphylococcus aureus* in foods. Surface plating method for isolation and enumeration. 1976.
2. International Organization for Standards (ISO). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive Staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) - Part 1: Technique using Baird Parker agar medium, 1st ed., ISO 6888-1:1999.
3. Jablonski, L.M. and G.A. Bohach. 1997. *Staphylococcus aureus*. In M. Doyle, L. Beuchat and T. Montville (eds.), Food microbiology fundamentals and frontiers. ASM, Washington, DC.
4. Bannerman, T.L. 2003. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, and R.H. Tenover (eds.), Manual of clinical microbiology, 8th edition. ASM, Washington DC.
5. Bennett, R.W. and G.A. Lancefield. 1998. *Staphylococcus aureus*. In FDA, Bacteriological analytical manual, 8th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.
6. Toranzo, G.A., G.A. McFeters and J.J. Borrego. 2002. Detection of microorganisms in environmental freshwaters and drinking waters. In C. Hurst, R. Crawford, G. Knudsen, M. McInerney and L. Stetzenbach (eds.), Manual of environmental microbiology, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly NCCLS). Approved Guideline M29. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Search for latest version at www.clsi.org
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, DC.
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. Dados em arquivo, BD Diagnostic Systems.

EMBALAGEM / APRESENTAÇÃO

REF	257074	Meios em placas prontos a usar, 20 cpu
REF	257099	Meios em placas prontos a usar, 120 cpu

INFORMAÇÕES ADICIONAIS

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



Becton Dickinson GmbH

Tullastrasse 8 – 12

D-69126 Heidelberg/Germany

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

Reception_Germany@europe.bd.com

<http://www.bd.com>

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

AOAC is a trademark and Performance Tested is a service mark of AOAC International.

CHROMagar is a trademark of Dr. A. Rambach.

Difco is a trademark of Difco Laboratories, subsidiary of Becton, Dickinson and Company.

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection

BD, BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company. © 2011 BD