



BD BBL CHROMagar O157

Patente americana 6.165.743



*See footnote below

UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O **BBL CHROMagar O157** é um meio selectivo para o isolamento, diferenciação e presumível identificação de estirpes de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de fontes clínicas, veterinárias, alimentares e ambientais.

BBL CHROMagar O157 foi validado pelo AOAC-Research Institute no âmbito do programa Performance Tested MethodsSM para a análise de carne de vaca crua e cidra de maçã não pasteurizada usando os métodos BAM da FDA, ISO e FSIS da USDA.

PRINCÍPIOS E EXPLICAÇÃO DO PROCEDIMENTO

Método microbiológico.

E. coli O157:H7 é o agente patogénico mais frequentemente isolado nas fezes.⁴⁻⁶ Todavia, a ausência de diarreia sanguinolenta não exclui a presença de *E. coli* O157:H7.⁷ Este serotipo provoca uma ampla variedade de doenças, desde a diarreia ligeira não sanguinolenta até à diarreia sanguinolenta grave (colite hemolítica), síndrome hemolítico-urémico e morte.⁴⁻⁶

O isolamento de *E. coli* O157:H7 é superior ao de alguns outros agentes patogénicos entéricos comuns, especialmente *Shigella*, em muitas áreas e grupos etários. A transmissão faz-se frequentemente por ingestão de carne de vaca crua ou mal cozinhada; também foram implicados outros alimentos.⁴⁻⁶ Para além disso, pode ocorrer transmissão inter-pessoal, bem como a partir de fontes de também água recreativa.⁴⁻⁶

CHROMagar O157 destina-se ao isolamento, diferenciação e presumível identificação de *E. coli* O157:H7. Graças aos substratos cromogénicos presentes no meio, as colónias de *E. coli* O157:H7 produzem uma cor roxa, permitindo assim a identificação presumível da placa de isolamento primário e a diferenciação de outros microrganismos. Em amostras com números baixos de *E. coli* O157:H7, os métodos de enriquecimento podem revelar-se úteis antes de proceder à inoculação do meio.

CHROMagar O157 foi originalmente desenvolvido 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 O157**.

Em concreto, peptonas **Difco** fornecem os nutrientes. A adição de telurito de potássio, cefixima e cefsulodina, reduz o número de bactérias que não *E. coli* O157:H7 proliferando neste meio. A mistura de cromogénios é composta por substratos artificiais (cromogénios), que libertam um composto colorido insolúvel quando hidrolisado por uma enzima específica. *E. coli* O157:H7 utiliza um dos substratos cromogénicos produzindo colónias de cor roxa. Considera-se a proliferação de colónias de cor roxa como presumível para *E. coli* O157:H7 em **BBL CHROMagar O157**. Bactérias diferentes de *E. coli* O157:H7 podem utilizar outros substratos cromogénicos, resultando no aparecimento de colónias de cor azul a azul-esverdeadas ou, caso não se utilize nenhum dos substratos cromogénicos, as colónias podem ter a sua cor natural. Isto facilita a detecção e diferenciação de *E. coli* O157:H7 relativamente a outros microrganismos.

*AS AMOSTRAS FORNECIDAS PELO PRODUTOR DESTA MODELO 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 Methods*, CERTIFICADO NÚMERO 090501.

REAGENTES

BD CHROMagar O157 Medium

Fórmula Aproximada* Por Litro de Água Purificada

Cromopeptona	16,0 g
Cloreto de Sódio	7,0 g
Mistura de cromogénios	0,65 g
Telurito de potássio	2,5 mg
Cefixima	0,05 mg
Cefsulodina	4,0 mg
Agar	14,0 g

pH: 7,1 ± 0,2

*Ajustada e/ou suplementada 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. Proteger 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 Padrão⁸⁻¹¹ e as linhas de orientação da instituição.

Nas amostras alimentares podem estar presentes microorganismos patogénicos, incluindo *E. coli* O157. 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 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. Abra apenas quando estiver pronto a utilizar. As placas podem ser inoculadas até terminar o prazo de validade (ver a etiqueta da embalagem) e incubadas durante o tempo de incubação recomendado. Antes da inoculação, deixar o meio aquecer até à temperatura ambiente.

As placas são fornecidas em pilhas de 10 e poderão 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 a luz poderá destruir os cromogénios.**

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>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 700728 (=NCTC 12900)	Crescimento razoável a excelente. Colónias cinzento-violeta a rosa-violeta (= roxo)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Inibição parcial a completa; colónias azul-verde; podem apresentar um halo azul-verde
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	Crescimento: Colónias azul-verdes a azuis
Não inoculadas	Incolor a bege claro, transparente

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

BD CHROMagar O157 Medium (placas **Stacker** de 90 mm). Microbiologicamente controlado.

Materiais Necessários mas Não Fornecidos: Meios de cultura auxiliares, reagentes, microrganismos de controlo da qualidade e outro equipamento laboratorial, conforme necessário.

Tipos de amostra

Para o uso clínico, consultar os procedimentos laboratoriais para pormenores sobre os procedimentos para colheita de amostras e sua manipulação. Este meio é usado para o isolamento de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de amostras de fezes ou zaragatoas rectais de doentes com suspeita de infecção por este agente.

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.

Consultar também **CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO E LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO**.

Procedimento do teste

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

Para amostras clínicas, logo após a recepção no laboratório, inocular a amostra numa placa com **BBL CHROMagar O157** e espalhar para obter o isolamento. Se a amostra estiver a ser cultivada a partir de uma zaragatoa, fazer rolar a zaragatoa sobre uma pequena área da superfície na extremidade e, em seguida, espalhar a partir desta área com um ansa. Em alternativa, as placas podem ser inoculadas a partir de pré-enriquecimentos. Incubar as placas em condições aeróbias, a uma temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante um período de 18 a 24 h em posição invertida (com o lado do agar voltado para cima). Também se podem inocular outros meios, tais como **BD MacConkey II Agar**, visando permitir a detecção de outros agentes patogénicos entéricos.

Para amostras alimentares, consultar as referências adequadas e seguir os métodos padrão aplicáveis. Inocular caldo de enriquecimento incubado ou partícula de amostra alimentar rastreada em **BBL CHROMagar O157** e espalhar para obter o isolamento. Incubar as placas em condições aeróbias, a uma temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante um período de 18 a 24 h em posição invertida (com o lado do agar voltado para cima).

Resultados

Após uma incubação correcta, ler as placas contra um fundo branco. *E. coli* O157:H7 irá produzir colónias de cor roxa no meio **BBL CHROMagar O157**. Todas as colónias roxas devem ser confirmadas bioquímica e/ou serologicamente antes de serem reportadas como *E. coli* O157:H7.^{1,2,3,6} Os microrganismos Gram-positivos devem estar totalmente inibidos.

Mircroorganismos Gram-negativos para além de *E. coli* O157:H7 serão inibidos ou produzirão colónias incolores, azuis, verdes, azuis-verdes (aqua) ou de cor natural.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO E LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

O **BD CHROMagar O157** é um meio cromogénico para o isolamento selectivo e presumível identificação de *E. coli* O157:H7 a partir de fontes clínicas, veterinárias, alimentares e ambientais.

Resultados de desempenho¹²

Testes clínicos: Procedeu-se à avaliação de um total de 110 isolados fecais congelados e 16 culturas de fezes (10 frescas e 6 arquivadas) num hospital metropolitano utilizando **BBL CHROMagar O157**, Sorbitol MacConkey (SMAC) e Sorbitol MacConkey com Cefixime e Telurito (SMAC-CT). Os isolados fecais congelados consistiram em 50 *E. coli* O157:H7, 15 *E. coli* não O157, 8 *E. coli* não O157 positivas para a toxina Shiga e 37 outras *Enterobacteriaceae* e bastonetes não fermentadores Gram-negativos. Verificou-se que sete das 16 fezes testadas eram positivas para *E. coli* O157:H7. Registaram-se as seguintes sensibilidades e especificidades:

	Sensibilidade (No.)	Especificidade (No.)
BBL CHROMagar O157	98% (56/57)	100% (69/69)
SMAC	96% (55/57)	80% (55/69)
SMAC-CT	100% (57/57)	93% (64/69)

Teste de produtos agroalimentares

BBL CHROMagar O157 foi validado pelo AOAC-Research Institute no âmbito do Performance Tested Methods Program.¹² **BBL CHROMagar O157** foi avaliado relativamente à detecção de *E. coli* O157:H7 em carne de vaca crua e cidra de maçã não pasteurizada utilizando amostras semeadas. A recuperação de *E. coli* O157:H7 em **BBL CHROMagar O157** foi comparada com a dos meios em placa de referência da BAM da FDA, ISO e FSIS da USDA. Cumpriram-se os procedimentos de rastreio e enriquecimento recomendados de referência para os meios de referência e **BBL CHROMagar O157**. A separação imunomagnética (IMS) foi efectuada de acordo com os métodos USDA e ISO. Das 180 amostras alimentares testadas, 45 foram testadas usando os métodos BAM da FDA e FSIS da USDA, tendo 90 sido testadas usando métodos ISO. **BBL CHROMagar O157** produziu uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 100% comparativamente com os métodos de referência para as duas matrizes alimentares. Não se registou qualquer falso negativo nos testes das matrizes alimentares. Com base na análise do Chi-quadrado, não se registou qualquer diferença estatística relativamente à recuperação utilizando o método **BBL CHROMagar O157** em comparação com os meios em placa de referência. Os isolados conhecidos, incluindo 54 estirpes de *E. coli* O157:H7 (3 das quais estirpes não móveis) e 32 estirpes não *E. coli* O157:H7, foram avaliados em **BBL CHROMagar O157** com uma sensibilidade e especificidade de 100%. Os resultados destes estudos demonstram que **BBL CHROMagar O157** é um meio eficaz para a recuperação e detecção de *E. coli* O157:H7 em carne de vaca crua e cidra não pasteurizada utilizando os métodos BAM da FDA, ISO e FSIS da USDA. Ver o Quadro 1 para o resumo dos resultados do estudo de comparação dos métodos de validação.

Quadro 1: Resumo dos resultados da comparação dos métodos de validação

Matriz Alimentar	Método	Nível de inóculo	Total de amostras	Total de positivos	Positivos de referência	Positivo para CHROMagar O157	Concordância entre métodos ¹	Chi-Quadrado ³
Carne de vaca crua	Carne de vaca USDA	Alto	20	15	12	15	85% ²	1,33
		Baixo	20	13	10	13	85% ²	1,33
		Controlo	5	0	0	0	-	-
Carne de vaca crua	Carne de vaca ISO	Alto	20	17	16	17	95% ²	0,00
		Baixo	20	10	9	10	95% ²	0,00
		Controlo	5	0	0	0	-	-
Cidra não pasteurizada	Cidra ISO	Alto	20	19	19	19	100%	0,00
		Baixo	20	14	14	14	100%	0,00
		Controlo	5	0	0	0	-	-
Cidra não pasteurizada	Sidra FDA	Alto	20	13	13	13	100%	0,00
		Baixo	20	10	10	10	100%	0,00
		Controlo	5	0	0	0	-	-

¹ Representa a percentagem de amostras positivas e negativas confirmadas, combinadas, que eram equivalentes entre os métodos de referência e **BBL CHROMagar O157**.

² Amostras positivas adicionais detectadas pelo método **BBL CHROMagar O157**: 3 positivos adicionais ao testar carne de vaca crua pelo método USDA / FSIS e 1 positivo adicional ao testar carne crua pelo método ISO.

³ Valores de Chi-quadrado < 3,84 indicam a ausência de diferenças significativas com $p < 0,05$.

Limitações do Procedimento

BBL CHROMagar O157 não detecta serotipos entero-hemorrágicos ou entero-patogénicos de *E. coli* diferentes do O157:H7, dado que estes podem diferir bioquimicamente. Estirpes de *E. coli* O157:H7 positivas para β -glucuronidase não serão detectadas com **BBL CHROMagar O157**; todavia, estas estirpes são raras.

BBL CHROMagar O157 não faz a diferenciação entre as estirpes de *E. coli* O157:H7 que produzem toxinas das que não as produzem.

Podem crescer neste meio microrganismos diferentes de *E. coli* O157:H7, tais como *Proteus* spp.; todavia, produzem habitualmente uma cor diferente. Caso se observem colónias roxas não isoladas, o isolamento pode ser obtido mediante subcultura noutra placa de **BBL CHROMagar O157**. Foram identificadas estirpes raras de *E. coli* (bioquimicamente semelhantes a *Shigella*) que produzem resultados falsos positivos em **BBL CHROMagar O157**. A incubação a temperaturas inferiores às recomendadas pode atrasar a detecção de reacções positivas. Se a temperatura de incubação for inferior a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, as placas devem ser incubadas durante 24 h antes de serem reportadas como negativas.¹²

São necessários testes de confirmação para uma identificação definitiva.^{1-3,6}

Este meio não deve ser usado para o isolamento de agentes patogénicos entéricos diferentes de *E. coli* O157:H7.

REFERÊNCIAS

1. U.S. Food and Drug Administration. 2002. Bacteriological analytical manual (online), Chapter 4A: Diarrheagenic Escherichia coli. AOAC International, Gaithersburg, MD. <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>
2. U. S. Department of Agriculture. 2002. Detection, isolation and identification of Escherichia coli O157:H7 and O157:NM (Nonmotile) from meat products. In Microbiology laboratory guidebook MLG 5.03.
3. International Organization for Standards (ISO) Microbiological Methods, ISO 16654: Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for the detection of Escherichia coli O157, First Edition, 2001-05-01.
4. Moe, C. 2002. Waterborne transmission of infectious agents. In C. Hurst, R. Crawford, G. Knudsen, M. McInerney, and L. Stetzenbach (eds.), Manual of environmental microbiology, 2 nd ed. American Society for Microbiology, Washington, DC.
5. Doyle, M., T. Zhao, J. Meng, and S. Zhao. 1997. Escherichia O157:H7. In M. Doyle, L. Beuchat, and T. Montville (eds.), Food microbiology fundamentals and frontiers. American Society for Microbiology, Washington, DC.
6. Bopp, C.A., F.W. Brenner, P.I. Fields, J.G. Wells, and N.A. Strockbine. 2003. Escherichia, Shigella and Salmonella. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, J.H. Jorgensen and R.H. Tenover (eds.), Manual of clinical microbiology. 8 th ed. American Society for Microbiology, Washington DC.
7. CDC MMWR Jan 26, 2001/50 (RR02): 1-69. Diagnosis and management of foodborne illness.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. 2 nd ed., NCCLS, Wayne, Pa.
9. 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.
10. U.S. Department of Health and Human Services. 1999. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, HIHS Publication (CDC), 4 th ed. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
11. 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.
12. Data on file, BD Diagnostic Systems.

EMBALAGEM / APRESENTAÇÃO BD CHROMagar O157 Medium

INFORMAÇÕES ADICIONAIS

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



Becton Dickinson GmbH
BD Diagnostic Systems
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

BD Diagnostic Systems Europe
Becton Dickinson France SA
11 rue Aristide Bergès
38800 Le Pont de Claix/France
Tel: +33-476 68 3636 Fax: +33-476 68 3292 <http://www.bd.com>

AOAC is a trademark and Performance Tested Methods is a service mark of AOAC International.
ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.
CHROMagar is a trademark of Dr. A. Rambach.
Difco is a trademark of Difco Laboratories, subsidiary of Becton, Dickinson and Company.
BD, BD Logo and BBL are trademarks of Becton, Dickinson and Company.
© 2006 BD.