

INSTRUÇÕES GERAIS DE UTILIZAÇÃO

Meios prontos a usar e parcialmente concluídos

Este documento fornece informações sobre a estrutura dos documentos de **Instruções de utilização** e contém informações adicionais sobre a utilização de meios prontos a usar e parcialmente concluídos da **BD**.

As informações adicionais não fornecidas nos documentos individuais de Instruções de utilização são apresentadas nestas caixas de texto.

O **cabeçalho** na página 1 de todos os documentos contém a **marca CE**, caso se trate de um produto para **IVD** de acordo com a Directiva europeia relativa à utilização em diagnóstico *in vitro*.¹ Além disso, estão também apresentados o **número e a versão** (por exemplo, PA-123456.01 para meios em placas e BA-123456.01 para meios em frascos) **dos documentos e a data da revisão** (mês e ano). O número e a versão dos documentos são repetidos no **rodapé** de cada página.

Em seguida, é apresentado o **nome do produto**. Alguns documentos de **Instruções de utilização** contêm as descrições de vários meios com formulações e aplicações semelhantes.

UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

Nesta secção é indicada a área de aplicação. Caso os produtos sejam utilizados para aplicações diferentes, o meio ou o procedimento deverá ser validado pelo utilizador.

A **BD Diagnostic Systems** não assume qualquer tipo de responsabilidade, caso o produto seja utilizado em aplicações, microorganismos ou procedimentos não recomendados nas **Instruções de utilização**.

PRINCÍPIOS E EXPLICAÇÃO DO PROCEDIMENTO

Nesta secção é descrito o princípio do método ("Método microbiológico"). Além disso, é apresentada uma explicação da história e desenvolvimento do meio, os princípios do procedimento e a função dos ingredientes conforme listado em **REAGENTES**.

REAGENTES

Esta secção contém a fórmula e o pH do produto.

Na Tabela de fórmulas, as quantidades dos ingredientes [g, mg, µg, mL, UI, U, etc] são mencionadas apenas uma vez e novamente caso sejam alteradas. Em seguida, está apresentado um **exemplo**:

BD CHROMagar O157

Fórmula* Por Litro de Água Purificada

Cromopeptona	22,0 g	←quantidade em [g]
Cloreto de sódio	5,0	
Telurite de potássio	2,5 mg	
Cefixima	0,05	←quantidade em [mg]
Cefsulodina	4,0	←quantidade em [mg]
Mistura cromogénica e selectiva especial	1,0 g	←quantidade em [g]
Ágar	12,0	
pH: 7.1 ± 0.2		

PRECAUÇÕES

Se estiverem identificados com o símbolo **IVD**, os meios prontos a usar ou parcialmente concluídos da **BD** destinam-se a ser utilizados para diagnóstico *in vitro*, conforme definido na Directiva europeia relativa a dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro*.¹ Além disso, os meios podem ser utilizados noutras áreas de microbiologia, conforme as indicações para o respectivo produto. Estes produtos foram concebidos para uso profissional e só deverão ser utilizados por pessoal com os conhecimentos e formação adequados. Os produtos não devem ser utilizados pelos doentes para auto-diagnóstico. **Se estiverem identificados com “Para utilização em laboratório”, estes produtos destinam-se a ser utilizados em microbiologia industrial ou geral, biotecnologia ou higiene geral e não deverão ser utilizados para o processamento de amostras clínicas humanas.**

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

Utilizar técnicas assépticas de manuseamento das amostras e produtos antes, durante e após a utilização.

Segurança biológica e química do produto

Esta secção poderá conter informações adicionais sobre perigos biológicos e/ou químicos específicos, indicados pelos símbolos apropriados em conjunto com as frases apropriadas de R (risco) e S (segurança).²

No que diz respeito aos riscos resultantes da utilização de materiais de origem animal, a **BD** está empenhada em tentar obter este tipo de materiais principalmente a partir da Austrália, Nova Zelândia e dos Estados Unidos. Nenhum destes países referiu casos de BSE (encefalopatia espongiforme bovina) no gado nativo. A **BD** obtém também materiais de origem animal provenientes de outros países [por exemplo, Argentina, Brasil, Colômbia, México, África do Sul e Uruguai]. Nenhum destes países referiu casos de BSE no gado nativo.

Risco biológico resultante de amostras e microorganismos cultivados em meios microbiológicos

Cumprir as precauções estabelecidas contra perigos microbiológicos. As amostras e culturas de microorganismos deverão ser manuseadas de acordo com as directrizes e legislação locais relativamente a materiais de risco biológico. De acordo com a Directiva europeia 2000/54/CE, a maioria dos agentes patogénicos bacterianos e fúngicos estão incluídos no grupo de risco 2. Procedeu-se à criação do grupo de risco 3** de modo a incluir *Salmonella* Typhi, *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC; também designada por STEC = *E. Coli* produtora da toxina Shiga), *Shigella dysenteriae* (tipo 1) e uma diversidade de outras bactérias e fungos. Entre os restantes agentes patogénicos bacterianos e fúngicos, todos os *Brucella* spp., *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. Ulcerans* e *Histoplasma capsulatum* estão incluídos no grupo de risco 3. Para mais informações, consultar o Anexo III da Directiva 2000/54/CE.³ Esta directiva, entre outros, pode ser directamente consultada em www.europa.eu/index.htm

Eliminação do produto:

Depois da utilização e antes da eliminação, os recipientes de amostras e todo o material contaminado, incluindo os meios de cultura utilizados e os recipientes de cultura contaminados, deverão ser autoclavados durante 20 a 30 min a uma temperatura de 121°C ou superior (caso seja necessário esterilizar volumes de material eliminado de maior dimensão) ou incinerados através de procedimentos validados.

ARMAZENAMENTO E PRAZO DE VALIDADE

Os meios em placas prontos a usar da **BD** deverão ser armazenados a uma temperatura entre +2 e +8°C. Os meios em frascos e dipslides deverão ser armazenados à mesma temperatura ou a temperaturas de armazenamento diferentes.

Além das **Instruções de utilização** específicas, a temperatura de armazenamento está indicada no rótulo da embalagem ou caixa do produto.

Evitar congelar e aquecer excessivamente.

O congelamento poderá resultar na deterioração completa dos agares em gel ou em precipitações nos meios líquidos. Se o produto for conservado a temperaturas superiores à temperatura de armazenamento indicada durante um longo período de tempo, tal poderá resultar na deterioração dos ingredientes do meio. Este facto aplica-se, em especial, aos agentes selectivos como, por exemplo, os antimicrobianos.

Poderá desenvolver-se uma humidade excessiva devido à água em condensação após alterações de temperaturas subsequentes extremas (por exemplo, de 2°C para 25°C e novamente para 2°C) em todos os meios sólidos.

Os meios em placas com humidade em excesso deverão ser secos antes da inoculação, por exemplo, colocando-os com as tampas entreabertas numa incubadora limpa a uma temperatura entre 30 e 37°C por um período nunca superior a uma hora. Não dessecar os meios! O tempo de exposição exacto depende da humidade do ar na incubadora.

Além disso, é também indicado o **armazenamento da embalagem aberta**. O armazenamento de pilhas abertas de meios em placas indicado, refere-se ao armazenamento refrigerado num local limpo.

A contaminação durante o armazenamento deverá ser evitada pelo utilizador, por exemplo, embalando as placas em sacos de plástico limpos.

No que respeita ao armazenamento de meios em frascos de unidades de embalagens abertas, aplica-se o prazo de validade indicado no rótulo das embalagens e nos frascos, desde que não tenham sido abertos.

Todos os meios prontos a usar ou parcialmente concluídos deverão ser armazenados no escuro.

Caso sejam expostos à luz artificial, luz solar ou luz UV durante um longo período, o desempenho de todos os meios poderá ficar reduzido. Diversos meios como, por exemplo, meios cromogénicos, ágar de Endo, entre outros, são particularmente sensíveis a uma iluminação intensa antes e durante a incubação.

Todos os meios prontos a usar ou parcialmente completos da **BD** podem ser utilizados até ao fim do prazo de **validade** e incubados durante o período de incubação recomendado.

Por exemplo, tal inclui a inoculação de um meio micobacteriano no dia em que termina o prazo de validade, seguida por seis semanas de incubação. Evitar a dessecação do meio durante a incubação. O prazo de validade (símbolo de ampulheta) é indicado nos recipientes individuais e no rótulo da embalagem. O formato Ano-Mês-Dia é utilizado em todos os produtos, por exemplo, 2004-06-09 significa 9 de Junho de 2004.

CONTROLO DE QUALIDADE PELO UTILIZADOR

Os procedimentos de controlo de qualidade indicados nas **Instruções de utilização** deverão ser realizados pelo utilizador. As estirpes de teste mencionadas nesta secção correspondem normalmente, embora nem sempre, às estirpes utilizadas nos procedimentos de controlo de qualidade para o teste de lançamento do fabricante que poderão incluir estirpes de teste adicionais. Na maioria das vezes, são utilizadas estirpes da *American Type Culture Collection* (= ATCC; www.atcc.org), mas também se utilizam estirpes de colecções europeias como, por exemplo, da *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* (= DSM; www.dsmz.de) ou *National Collection of Type Cultures* (= NCTC; www.hpacultures.org.uk).

Consultar o **Certificado de análise** do respectivo lote do produto que indica o conjunto de estirpes de teste reais e os resultados utilizados para o lançamento do lote.

Os procedimentos para a realização do teste de desempenho microbiológico poderão depender do tipo de meio e método utilizados.

Utilizar sempre suspensões de estirpes de teste frescas de culturas de um dia para o outro em meios líquidos apropriados (por exemplo, caldo trípico de soja ou **Trypticase** para aeróbios e o caldo de Schaedler com hemina e vitamina K para anaeróbios). Os tempos de incubação de pré-culturas deverão ser aumentados se a estirpe de teste demonstrar um desenvolvimento lento.

Para **testar a capacidade nutritiva de um meio em placas** de acordo com a norma CLSI M22, diluir a suspensão de inóculo de modo a se obter 1 a 2×10^4 UFC por placa.⁴ Deverá utilizar-se um inóculo dez vezes menos concentrado, caso não sejam obtidas colónias isoladas. De acordo com a DIN EN 12322, as propriedades promotoras de crescimento são testadas com 100 a 1000 UFC ou uma quantidade suficiente de UFC para fornecer colónias isoladas através de uma técnica apropriada de plaqueamento.⁵ Se as estirpes forem inoculadas através de uma técnica de placas quantitativas, 50 a 500 UFC por placa são normalmente apropriadas para se obter um número contabilizável de colónias. De acordo com as directrizes da USP e EP, deverão utilizar-se 10 a 100 UFC por placa (ou recipiente).^{6,7}

Para **testar a capacidade inibidora de um meio selectivo em placas**, de acordo com CLSI M22, deverá utilizar-se 1 a 2×10^5 UFC por placa para a inoculação e cerca de 10^4 ou mais UFC de acordo com a DIN EN 12322.^{4,5} Os inóculos muito elevados de estirpes indesejáveis poderão “sobrecarregar” o meio, resultando numa “ruptura” do crescimento. Para fins de comparação, incluir sempre um meio de referência de crescimento que deverá consistir num meio não selectivo que proporcione o crescimento ideal para todas as estirpes de teste. Para as estirpes aeróbias, os meios mais adequados para tal são o ágar de Columbia com sangue de ovino a 5%, para estirpes exigentes (por exemplo, *Neisseria gonorrhoeae*) o ágar chocolate, para anaeróbios o ágar de Schaedler com Vitamina K e

sangue de ovino a 5% e para os fungos o ágar Sabouraud glicosado. Nos meios selectivos, o crescimento de estirpes “indesejáveis” deverá ser parcial a completamente inibido. O grau de inibição depende do meio e das estirpes, mas o crescimento é normalmente reduzido por um factor de 10^3 a 10^4 (ou superior) em comparação com o crescimento no meio de referência de crescimento não selectivo.

Para testar o **desempenho de crescimento dos meios em frascos**, são utilizados métodos de comparação. Os tubos e os frascos de menor dimensão deverão ser inoculados com 10^5 ufc de acordo com a norma CLSI M22.⁴ De acordo com os procedimentos da EP, USP e DIN EN 12322 são necessários inóculos semelhantes aos listados anteriormente para os meios em placas.⁵⁻⁷ Os frascos com volumes de enchimento superiores a 10 mL deverão ser, em primeiro lugar, divididos em alíquotas em quantidades de 5 ou 10 mL em tubos estéreis e analisados da mesma forma.

Incubar e inspecionar os meios inoculados conforme descrito no respectivo produto.

Determinar o **pH**, através de potenciometria, à temperatura ambiente (25° C) para cumprimento dos valores especificados para o produto. O intervalo de pH apresentado nas **Instruções de utilização** consiste no intervalo predeterminado após o fabrico do meio. O intervalo poderá variar ligeiramente em relação ao prazo de validade e poderá depender do sistema de eléctrodos utilizado.

O utilizador pode analisar a **esterilidade do produto**, incubando várias placas (ou recipientes, por exemplo, frascos) a uma temperatura de incubação adequada (por exemplo, 28 a 35°C) durante 5 a 7 dias ou conforme apropriado para os procedimentos aplicáveis.^{6,7}

Relativamente aos meios líquidos com uma turvação natural, deverá ser realizada uma repicagem num meio sólido apropriado (por exemplo, placas de ágar de soja **Trypticase**) após a incubação para determinar a esterilidade. A coloração de Gram e a microscopia poderão ser úteis em caso de dúvida.

PROCEDIMENTO

Na secção **Materiais Fornecidos**, são indicados os meios e tipo de recipiente. A maioria dos meios em placas prontos a usar da **BD** são fornecidos em placas **BD Stacker** de 90 mm, concebidas para servirem de bloqueio de modo a minimizar o perigo de deslizamento das pilhas. Determinados meios em placas prontos a usar da **BD** são fornecidos em tipos diferentes de placas como, por exemplo, placas divididas (=biplacas), placas de contacto, placas de 150 mm ou placas quadradas, consoante a aplicação.

Os meios prontos a usar ou parcialmente concluídos da **BD** em frascos estão disponíveis em vários tamanhos, volumes de enchimento e com sistemas de fecho diferentes, consoante a respectiva utilização e aplicação.

Nesta secção, são apresentadas as informações sobre o estado microbiológico do produto:

Os meios em placas, *dipslides* e determinados meios em frascos são cheios de forma asséptica, ou seja, são “microbiologicamente controlados”. Para estes meios, a norma DIN EN 12322 permite uma taxa de contaminação de $\leq 5\%$.⁵ No entanto, os critérios de lançamento internos são mais rigorosos. Os meios em frascos que são esterilizados no recipiente final estão identificados com o símbolo de “estéril”, em conjunto com o símbolo de “termómetro” (para “esterilizado em autoclave”). Para estes meios, aplicam-se os critérios relativos aos produtos estéreis de acordo com a EP.⁶

Na secção **Materiais não fornecidos**, são apresentados os equipamentos especiais necessários para a realização do teste. Os materiais de utilização regular como, por exemplo, ansas de inoculação, expansores, pipetadores, incubadoras etc, não são indicados uma vez que são universalmente necessários num laboratório microbiológico.

Em **Tipos de amostra**, são descritas as amostras que devem ser utilizadas com o meio específico. Caso seja necessário, os requisitos especiais para a colheita e transporte da amostra são indicados em **Colheita e transporte**.

As amostras deverão ser colhidas e transportadas de forma adequada, utilizando os meios de transporte apropriados para evitar a dessecação, exposição excessiva ao oxigénio ou o crescimento excessivo dos organismos comensais. Além disso, o tempo necessário desde a colheita até ao processamento das amostras no laboratório é importante e deverá ser o mais curto possível. Para informações mais pormenorizadas sobre os métodos de colheita e transporte de agentes patogénicos específicos, consultar a bibliografia adequada.⁸

Na secção **Procedimento do teste**, estão descritas as informações de carácter geral e específico relativamente à inoculação do meio específico e, se necessário, a utilização de meios adicionais.

Inoculação dos meios

De acordo com as boas práticas laboratoriais em microbiologia, para se proceder à inoculação dos meios com a amostra é necessário espalhar a amostra para obter o isolamento em três passos em cada placa, utilizando uma ansa novamente esterilizada antes de cada passo. Caso sejam utilizadas ansas pré-esterilizadas, deverá ser utilizada uma ansa individual para cada passo. Se o material estiver a ser cultivado directamente de uma zaragatoa, fazer rolar a zaragatoa sobre uma pequena área da superfície, na extremidade; em seguida, espalhar com as ansas a partir desta área inoculada, para obter o isolamento, executando dois passos.

Esta técnica permite o isolamento de colónias únicas a partir de culturas mistas. As culturas puras, obtidas a partir de colónias únicas, são consideradas obrigatórias para a realização de testes de identificação e sensibilidade dos isolados.

Além disso, nesta secção faz-se também referência à temperatura e tempo de incubação.

De acordo com as boas práticas laboratoriais, deve-se inspeccionar regularmente a **temperatura real das incubadoras**. Caso as temperaturas se situem abaixo ou acima de um determinado intervalo, tal poderá resultar na perda de viabilidade dos organismos nas culturas, na redução do crescimento ou em resultados irreproduzíveis.

Durante a incubação dos meios em placas prontos a usar, é necessário fornecer a **humidade** adequada, em especial se os meios forem incubados durante um longo período. Neste caso, não é aconselhável a utilização de incubadoras com circulação de ar, uma vez que poderá ocorrer uma dessecação considerável dos meios, especialmente se a humidade do ar no laboratório for baixa. As culturas em placas de microorganismos que estão adaptados a ambientes húmidos, como é o caso de *Legionella*, deverão ser incubadas em câmaras ou frascos humedecidos. As placas também podem ser seladas com fita adesiva de modo a reduzir a evaporação. No entanto, poderá ainda ser possível uma troca de gases pouco significativa.

Tal é também aplicável aos meios em tubos. Durante a incubação, as tampas de rosca deverão estar sempre ligeiramente desapertadas.

Na secção **Resultados**, são fornecidas as informações sobre o aspecto dos organismos no meio específico. Para os meios de isolamento e crescimento de utilização geral, não é possível fornecer estas informações específicas para todos os organismos com capacidade para se desenvolverem no meio. Deverá ser consultada a bibliografia apropriada.⁹

Eventualmente, são fornecidas informações específicas na secção **Cálculo e interpretação dos resultados**. Esta secção é apresentada nos casos em que o diagnóstico depende da quantidade de agentes patogénicos numa amostra. Isto aplica-se, por exemplo, aos meios como o ágar CLED utilizados para a contagem de bactérias na urina.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO E LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Nesta secção, é analisado o desempenho do meio e, se aplicável, são apresentados os tipos de organismos que podem ser isolados com o meio em conjunto com fontes de obtenção de provas. Para os meios novos ou recentemente apresentados, os resultados das avaliações de desempenho poderão ser indicados nesta secção.

É necessário referir que raramente um único meio é adequado para detectar todos os organismos com potencial significado clínico numa amostra. Além disso, poderão existir várias estirpes numa população microbiana que não se desenvolvem de forma adequada num determinado meio, mesmo que este seja considerado apropriado para a detecção da maior parte das restantes estirpes da espécie em questão. Por essa razão, para a maioria das amostras, são inoculados em simultâneo dois ou três meios diferentes ou procede-se à combinação de um meio não selectivo com um ou dois meios selectivos, ou utilizam-se dois meios selectivos com um grau de selectividade diferente.

Nesta secção, são ainda mencionadas as **limitações** conhecidas **na aplicação** do meio. Para a maioria dos meios é necessária a execução de testes adicionais para se obter uma identificação final dos organismos isolados.

BIBLIOGRAFIA

Nesta secção, é apresentada a literatura citada ao longo do documento.

EMBALAGEM/APRESENTAÇÃO

Os **números de catálogo**, os **tamanhos da embalagem** e, caso se apliquem, os diferentes formatos são apresentados nesta secção.

INFORMAÇÕES ADICIONAIS

Nesta secção, são apresentadas informações adicionais incluindo a morada do fabricante (símbolo para “fábrica”). Por último, são apresentadas as marcas comerciais mencionadas nos documentos específicos.

BIBLIOGRAFIA CITADA NESTAS INSTRUÇÕES GERAIS DE UTILIZAÇÃO

1. Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on in vitro diagnostic medical devices. Official Journal L 331 , 07.12.1998, p. 0001 - 0037
2. Directive 67/548/EEC of the European Parliament and of the Council of 27 June 1967 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances Official Journal P 196, 16.08.1967, p. 0001 – 0098.
3. 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 98/391/EEC). Official Journal L 262, 17.10.2000, p. 0021-0045.

4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly NCCLS). Standard M22. Quality assurance for commercially prepared microbiological culture media. Wayne, PA, USA. *Search for latest version at **www.clsi.org***
5. DIN EN 12322. 1999. Culture media for microbiology – performance criteria for culture media. Beuth Verlag Berlin.
6. Council of Europe. European Pharmacopoeia. European Pharmacopoeia Secretariat. Strasbourg/France. *Search for latest version at **www.pheur.org***
7. U.S. Pharmacopeial Convention. The U.S. Pharmacopeia /The national formulary. U.S. Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, Md. *Search for latest version at **www.uspnf.com***
8. Thomson, R.B. 2007. Specimen collection, transport, and processing: bacteriology. *In*: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry, and M. A. Pfaller (ed.). Manual of clinical microbiology, 9th ed. American Society for Microbiology, ASM Press, Washington, D.C.
9. Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry, and M. A. Pfaller (ed.). 2007. Manual of clinical microbiology, 9th ed. American Society for Microbiology, ASM Press, Washington, D.C.

CHROMagar is a trademark of Dr. A. Rambach.

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.

BD, BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company. © 2009 BD

© 2009 Becton, Dickinson and Company