

**Finalidade:**

Meio de cultura utilizado na identificação bioquímica de cocos gram positivos.

**Registro ANVISA:**

10097010135

**Apresentação:**

510104 - BILI ESCULINA-AGAR-3mL-TB 13X100-CX 10TB

LB 172078  
Rev. 06 – 08/2024

## 1. INTRODUÇÃO

O Bile Esculina Ágar é um meio indicado para diferenciação de *Enterococcus* sp de *Streptococcus* grupo D.

A presença de bile no meio inibe o crescimento de microrganismos Gram negativos. A hidrólise da esculina em esculetina que reage com o citrato férrico formando um complexo negro, o que garante a diferenciação entre os dois gêneros.

A prova de bile-esculina baseia-se na hidrólise de esculina em presença de bile por determinadas bactérias. As bactérias bile-esculina positivas crescem em presença de sais biliares. A hidrólise da esculina gera glicose e esculetina. A esculetina reage com íons férricos resultando em um complexo de cor preta.

A principal utilização do Ágar Bile Esculina é a diferenciação entre estreptococos e enterococos do Grupo D e estreptococos não pertencentes ao Grupo D. Pode também ser usado para a identificação presuntiva de outros grupos de microrganismos.

Enterococos e estreptococos Grupo D. hidrolisam a esculina formando a esculetina e dextrose. A esculetina combina-se com citrato férrico no meio para formar um complexo castanho escuro ou preto que é indicativo de um resultado positivo. Os sais biliares inibem bactérias Gram-positivas que não os estreptococos e enterococos Grupo D.

O uso desses parâmetros forma a base do Ágar Bile esculina e foi descrito por Swan, que concluiu que o uso desse meio é uma alternativa válida ao agrupamento de Lancefield para o reconhecimento de estreptococos e enterococos do Grupo D.

Facklam confirmou ainda a sua utilidade na diferenciação de estreptococos e enterococos do Grupo D. dos estreptococos não pertencentes ao Grupo D., enquanto outros estudiosos utilizaram o meio para identificação presuntiva do grupo *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* entre as *Enterobacteriaceae*.

## 2. COMPOSIÇÃO

Formulação	Concentração/ L
Extrato Pancreático de Gelatina	5,0g
Extrato de Carne	3,0g
Sais Biliares	20,0g
Citrato Férrico	0,5g
Esculina	1,0g
Ágar	14,0g

pH 7,2± 0,2 a 25°C

A formulação pode ser ajustada e/ou suplementada, conforme necessário, para cumprir os critérios de desempenho.

## 3. AMOSTRA

### a- Tipos de amostras

- O material a inocular consiste em colônias de *Streptococcus* não hemolíticos.

- O laboratório deve estabelecer critérios de coleta, rejeição e conservação das amostras, conforme sua política da qualidade.

- Sempre considerar as necessidades específicas dos microrganismos alvos das análises, microrganismos com necessidades especiais (suplementos específicos ou ambiente

controlados) podem não apresentar crescimento adequado se semeados em meio de cultura que não apresente os requisitos mínimos.

## 4. INFORMAÇÕES GERAIS SOBRE O PRODUTO

### a- Princípio

Os enterococos e alguns estreptococos hidrolisam o glicosídeo esculina em esculetina e dextrose. A esculetina reage com um sal de ferro para formar um complexo castanho-escuro ou preto. O citrato férrico é incorporado no meio como um indicador da hidrólise da esculina e da formação de esculetina daí resultante. A bile de bovino é utilizada para inibir outras bactérias Gram-positivas além dos enterococos.

### b- Armazenamento e estabilidade

- Para fins de transporte, o produto pode permanecer em temperatura ambiente por até 72h. No laboratório os tubos devem ser armazenados em temperatura de 2 a 12°C, condições em que se mantém estáveis até a data de vencimento expressa em rótulo, desde que isento de contaminação de qualquer natureza. O uso de refrigerador tipo *frost-free* não é recomendado para meios de cultura devido ao efeito desidratante deste tipo de equipamento.

- Considerando que este produto é gelatinoso e sua composição pode apresentar até 80% de água, ao sofrer variações de temperatura (quente-frio ou frio-quente) todo meio de cultura pode gerar condensação, de pouco a muita, acumulando água no tubo.

- Conforme descrito em literatura, o laboratório deve retirar da refrigeração apenas a quantidade de produto que deverá ser utilizada em sua rotina e deixar estabilizar a temperatura, ou secar a água condensada, antes de sua utilização, em temperatura ambiente, podendo utilizar a incubação em estufa ( $\pm 37^\circ\text{C}$ ) para redução do tempo de secagem ou estabilização. A repetição do processo de refrigeração/estabilização não é recomendada, a constante troca de temperatura pode levar a desidratação do meio, expor o produto a contaminações ou gerar um acúmulo de água excessivo.

- A água acumulada por condensação, ocasionada por alguma variação de temperatura, não influencia no desempenho do produto, desde que este não apresente ressecamento ou diminuição de espessura.

- Devido a presença de substratos sensíveis, recomenda-se manter o produto protegido de incidência direta de luz (natural ou artificial) e evitar grandes variações de temperatura até a utilização.

### c- Precauções e cuidados especiais

- O produto é destinado apenas para o uso diagnóstico *in vitro*;

- Uso restrito por profissionais;

- Mesmo se tratando de produto livre de agentes infecciosos, recomenda-se tratar este produto como potencialmente infeccioso, observando o uso de equipamentos de proteção individual e coletivo;

- Não inalar ou ingerir;

- Não utilizar os tubos com sinais de contaminação, ressecamento ou com alterações de cor ou espessura;

- Não usar materiais com o prazo de validade expirado, ou que apresentem selo de qualidade rompido ou violado;
- Recomenda-se a leitura da diretriz aprovada para "Proteção de Trabalhadores de Laboratório e Infecções Obtidas no Trabalho - CLSI® M29-A" para o manuseio seguro;
- Para acondicionamento e descarte do material usado, autoclavar a 121°C por 20 minutos. Recomendamos o uso dos sacos DetriLab;

- Os procedimentos de manuseio referentes ao processamento e manuseio para o descarte deverá estar de acordo com a RDC 222, DE 28 DE MARÇO DE 2018 que dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde.

#### 5. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS (porém não fornecidos)

- Estufa bacteriológica;
- Alças bacteriológicas;
- Bico de Bunsen.

#### 6. PROCEDIMENTO TÉCNICO

- Retirar a caixa da refrigeração e, em ambiente asséptico, separar os tubos a serem usados, devolvendo o restante ao refrigerador;
- Colocar os tubos em estufa bacteriológica entre 35-37°C pelo tempo necessário para adquirirem esta temperatura, ou deixar estabilizar/secar em temperatura ambiente;
- Usando alça espalhar a amostra sobre a superfície inclinada do tubo conforme técnica adequada;
- Incubar o material em estufa bacteriológica entre 35-37°C por 24-48h;
- Realizar a leitura.

#### 7. RESULTADOS

Havendo crescimento com o desenvolvimento de uma coloração marrom-negra difusa pelo meio considerar a esculina hidrolisada pela bactéria em análise.

Se mais de metade da superfície do ágar inclinado tiver escurecido no prazo de 24 a 48 h, o teste é positivo. Se menos de metade da superfície do ágar inclinado tiver escurecido ou se não houver escurecimento no prazo de 24 a 48 h, o teste é negativo.

**Nota:** Todos os *Streptococcus* do grupo *D* são positivos para bile-esculina no intervalo de 48 horas.

#### 8. LIMITAÇÕES DO MÉTODO

(Riscos Residuais Identificados conforme RDC 36/2015)

Os resultados falsamente positivos ou negativos podem ocorrer, com maior frequência, nas seguintes situações:

- Tempo longo entre a semeadura da amostra e análise. Ao utilizar colônias isoladas em um período superior a 24 horas, o metabolismo bacteriano pode ficar comprometido e a leitura de alguns parâmetros podem consequentemente ficar defasados ou até mesmo não ocorrer. Em colônias recentes (inferior ao período de 18 horas) não se encontram com o metabolismo bem definido, e algumas provas podem não ocorrer.
- Incubação em temperatura inadequada.
- Sobrecarga de inóculo ou falta de inóculo. Inóculos mais carregados fornecem resultados falsamente positivos e inóculos mais fracos fornecem resultados falsamente negativos.
- Interpretação equivocada de resultados.
- Técnica de assepsia inadequada.
- Tempo excessivo ou insuficiente de incubação. Tempo excessivo de incubação fornece resultados falsamente positivos e tempo insuficiente fornece resultados falsamente negativos.
- Utilização de material vencido, contaminado ou em condições inadequadas.
- Contaminação cruzada por uso de acessórios não esterilizados corretamente ou ambiente não asséptico.
- Utilização de meios de cultura com aparência alterada.
- Não aguardar para que os materiais atinjam a temperatura ambiente no momento do uso.
- Erro na conservação do produto pode ocasionar desidratação do meio e alteração das propriedades dos componentes

#### OBS:

Alguns *Streptococcus viridans* (aproximadamente 3%) também podem hidrolisar a esculina na presença de bile.

A prova da bile esculina é apenas uma das etapas para a correta identificação de *Enterococcus spp*, havendo a necessidade de se executar outras provas como crescimento em MTS (Meio de Tolerância ao Sal entre outras).

#### 9. CONTROLE DA QUALIDADE

- *Materiais necessários*

*Cepas padrão: ATCC® (American Type Culture Collection) ou derivadas.*

- *Controle de qualidade recomendado:*

Parâmetro	Resultado esperado
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	Meio Inalterado
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Alteração do Meio (Meio Enegrecido)- Hidrólise da esculina
<i>Meio não inoculado</i>	Meio marrom esverdeado, levemente opaco, podendo apresentar pequenos precipitados.

#### 10. GARANTIA DA QUALIDADE

A Laborclin obedece ao disposto na Lei 8.078/90 - Código de Defesa do Consumidor. Para que o produto apresente seu melhor desempenho, é necessário que:

- o usuário conheça e siga rigorosamente o presente procedimento técnico;
  - os materiais estejam sendo armazenados nas condições indicadas;
  - os equipamentos e demais acessórios necessários estejam em boas condições de uso, manutenção e limpeza.
- Antes de ser liberado para venda, cada lote do produto é submetido a testes específicos, que são repetidos periodicamente conforme calendário estabelecido pela empresa até a data de vencimento expressa em rótulo. Os certificados de análise de cada lote podem ser obtidos no site [www.laborclin.com.br](http://www.laborclin.com.br). Em caso de dúvidas ou quaisquer problemas de origem técnica, entrar em contato com o SAC - Serviço de Assessoria ao Cliente através do telefone 0800-0410027 ou pelo e-mail [sac@laborclin.com.br](mailto:sac@laborclin.com.br). Quaisquer problemas que inviabilizem uma boa resposta do produto, que tenham ocorrido comprovadamente por falha da Laborclin serão resolvidos sem ônus ao cliente, conforme o disposto em lei.

#### 11. REFERÊNCIAS

- BARON, J.E., Pfaller, A.M., Tenover, C.F. and Yolken, H.R. Manual of clinical microbiology. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1999.
- Difco Manual, 2nd edition 2009.
- FORBES, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis, 2002.
- HUSSAIN, Z., R. Lannigan, and L. Stoakes. A new approach for presumptive identification of clinically important streptococci. Zbl. Bakt. Hyg. 1984.
- KONEMAN, Elmer; *et al.* Diagnostic Microbiology. Lippincott, USA, 5 ed., 1997.
- LARONE, D.H. Medically Important Fungi: a guide to identification. 3rd. Ed., Washington, American Society for Microbiology, 1994.
- MAHON, Connie, Manuvelis, George Jr. Diagnostic Microbiology. Saunders, USA, 1995.
- McFADDIN, J.F. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Ed. William & Wilkins Co., Baltimore, 1980.
- MURRAY, P.R. *et al.* Manual of Clinical Microbiology. 7th ed, American Society for Microbiology 1999.
- OPLUSTIL, C. P. *et al.* Procedimentos básicos em microbiologia clínica. 3. ed. São Paulo, 2010.

**Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda**

CNPJ 76.619.113/0001-31  
Insc. Estadual 1370012926  
Rua: Casimiro de Abreu, 521  
Pinhais/PR CEP 83.321-210  
Telefone: (41) 3661-9000  
[www.laborclin.com.br](http://www.laborclin.com.br)

**Responsável Técnico:**

Maire Wakamori – CRF/PR-20176  
Serviço de Assessoria ao Cliente  
SAC 0800-0410027  
[sac@laborclin.com.br](mailto:sac@laborclin.com.br)

## ANEXO 1 – LISTA DE SÍMBOLOS UTILIZADOS NOS RÓTULOS

	Código do produto		Número de lote
	Número de série		Fabricante
	Consultar instruções para utilização		Validade
	Temperatura de armazenagem (limite de temperatura)		Produto para saúde para diagnóstico <i>in vitro</i> .
	Não utilizar se a embalagem estiver danificada		Representante autorizado na Comunidade Européia
	Quantidade suficiente para <n> ensaios		Frágil, manusear com cuidado
	Esterilizado utilizando técnicas assépticas de processamento		Esterilização utilizando óxido de etileno
	Esterilização utilizando irradiação		Esterilizado utilizando vapor ou calor seco.
	Risco biológico		Cuidado. Importante consultar instruções de uso.
	Controle		Controle Negativo
	Controle Positivo		Manter seco
	Manter afastado da luz solar e longe do calor		Somente para avaliação de desempenho
	Não utilizar		Não reesterilizar

Fonte: ABNT NBR ISO 15223-1 – Terceira edição (24.08.2022)