

## Finalidade:

Meio para isolamento e identificação presuntiva de *Pseudomonas*.

## Registro ANVISA:

10097010134

## Apresentação:

540164 - CETRIMIDE AGAR 20mL PL 90X15 10PL

LB 172139

Rev. 07 – 07/2024

## 1. INTRODUÇÃO

A *Pseudomonas aeruginosa* (também conhecida como *Pseudomonas pyocyanea*) é uma bactéria gram-negativa, baciliforme (característica morfotintorial) e aeróbia. Seu ambiente de origem é o solo, mas sendo capaz de viver mesmo em ambientes hostis, sua ocorrência é comum em outros ambientes. É um patógeno oportunista, ou seja, que raramente causa doenças em um sistema imunológico saudável, mas explora eventuais fraquezas do organismo para estabelecer um quadro de infecção. Essa característica, associada à sua resistência natural a um grande número de antibióticos e antissépticos a torna uma importante causa de infecções hospitalares.

A infecção por *P. aeruginosa* é facilitada pela presença de uma doença de base, como neoplasias malignas e fibrose cística, ou por uma falha no sistema de defesa inespecífico do hospedeiro (ex: perda da barreira física da pele nos pacientes queimados ou com escaras e perda da integridade tecidual nos pacientes em uso prolongado de cateteres intravenosos ou urinários).

Para causar a doença, a bactéria precisa inicialmente se fixar à pele ou às mucosas do paciente, através de suas fimbrias e outras estruturas superficiais. Em seguida ela prolifera e coloniza a área, driblando as células de defesa através da produção da cápsula polissacarídica e da hemolisina. A partir do local onde a *P. aeruginosa* foi introduzida, ela invade o tecido subjacente e atinge a corrente sanguínea. Os fatores de virulência que permitem a invasão tecidual são a fosfolipase C, a toxina A e o flagelo (entre outros). O LPS é responsável nesta fase pelas manifestações sistêmicas: febre, choque, oligúria, leucocitose ou leucopenia, coagulação intravascular disseminada (CID) e síndrome da angústia respiratória do adulto (SARA). Os sinais e sintomas específicos da infecção por *Pseudomonas* dependem do órgão ou tecido onde o microrganismo se instalou inicialmente, este patógeno oportunista pode colonizar virtualmente qualquer tecido.

### Fatores de Virulência

Os fatores de virulência são os fatores próprios das bactérias utilizados para produzir as infecções. Estes fatores podem ser estruturais (ex: fimbrias) ou produzidos e liberados para o meio (ex: enzimas e toxinas).

Como principais fatores de virulência de *P. aeruginosa*, podemos citar:

- Fimbrias ou pili que se estendem a partir da superfície celular;
- Flagelo que confere mobilidade;
- Cápsula polissacarídica com ação anti-fagocitária, importante para escapar do Sistema Imune do hospedeiro;
- Proteases que destroem proteínas da matriz extracelular;
- Fosfolipase C que hidrolisa a lecitina, um fosfolípido da membrana celular das células animais;
- Hemolisina que promove morte celular, principalmente entre as células de defesa;
- Toxina A que promove necrose tecidual por interromper a síntese de proteínas nas células, mecanismo semelhante ao da toxina diftérica;
- Endotoxina (lipopolissacarídeo – LPS) presente na membrana externa, responsável pelas manifestações sistêmicas.

- Piocianina é um dos seus fatores de virulência da bactéria, conhecidos, em teste de laboratório, por causar morte em *Caenorhabditis elegans* por estresse oxidativo. No entanto, pesquisas indicam que o ácido salicílico pode inibir a produção de piocianina.

### Infecção Hospitalar

Nos hospitais é uma das bactérias responsáveis pelas infecções hospitalares, sendo responsável por 15% das bacteremias causadas por bactérias Gram-negativas. A partir de 1991 surgiram as primeiras infecções hospitalares por cepas multirresistentes sensíveis apenas à Colistina. Sua elevada frequência no ambiente hospitalar explica-se parcialmente pela sua resistência a antibióticos e antissépticos leves. Há evidências de que o uso de desinfetantes pode fazer com que as bactérias *P. aeruginosa* manifestem resistência não somente a ele, mas também aos antibióticos do tipo ciprofloxacina.

Um ponto importante da *P. aeruginosa* é a grande capacidade de formação de biofilmes, principalmente em encanamentos. Quando isso ocorre é necessária a realização da desinfecção pois, a partir deste momento, a água a ser consumida será seriamente contaminada pela bactéria. Quando isso ocorre em hospitais a situação se agrava devido ao risco da ingestão da bactéria por pessoas debilitadas.

### Suscetibilidade

Pessoas com fibrose cística, pacientes com câncer e portadores de doenças imunodepressoras são altamente suscetíveis ao agravamento do quadro de infecção por *Pseudomonas aeruginosa*. Nesses casos o índice de óbitos pode chegar a 50%.

### Prevenção

Deve-se evitar o contato de pacientes com sistema imunológico debilitado com flores, frutas e vegetais trazidos por familiares.

### Tratamento

Alguns especialistas dizem que o tratamento com antibióticos é inútil, pois o resultado normalmente é a infecção por uma variante da bactéria resistente a qualquer tipo de tratamento. Mas é possível orientar o tratamento baseando-se no comportamento laboratorial da amostra.

O uso geral dos poucos antibióticos que possuem efeito contra a *P. aeruginosa* é severamente restrito para evitar o desenvolvimento de variações da bactéria resistentes a estas drogas.

Pesquisas indicam que a colistina tem sido eficaz no tratamento de infecções causadas pelo *Pseudomonas aeruginosa*.

É de extrema importância a realização de um antibiograma para determinar a sensibilidade da cepa isolada aos antimicrobianos, tendo em vista o aumento das cepas multi-resistentes, principalmente no ambiente hospitalar.

As principais medidas terapêuticas para *P. aeruginosa* são:

- Associação de penicilina ativa contra *P. aeruginosa* (ticarcilina ou piperacilina) + aminoglicosídeo (gentamicina, amicacina ou tobramicina);
- Aztreonam, imipenem, quinolonas mais recentes (ciprofloxacina);
- Cefalosporinas de 4ª geração (ceftazidima).

**2. COMPOSIÇÃO**

Formulação	Concentração/ L
Digesto pancreático de gelatina	20,0g
Cloreto de magnésio	1,4g
Sulfato de Potássio	10,0g
Cetrimide (Tetradecyltrimethylammonium Bromide)	0,3g
Agar	13,6g
Água deionizada	1000mL

pH 7,2± 0,2 a 25°C

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

**3. AMOSTRA***a- Tipos de amostras*

- Podem ser utilizados diversos materiais clínicos ou materiais provenientes de cultura como amostra.
- 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*

Também conhecido por Pseudosel, é um meio de cultura seletivo e diferencial para isolamento e identificação de *Pseudomonas aeruginosa*.

O digesto pancreático de gelatina fornece os nutrientes necessários para apoiar o crescimento. A produção de piocianina é estimulada pelo cloreto de magnésio e sulfato de potássio no meio. O Cetrimide é um composto detergente catiônico de amônio quaternário, que é inibidor de uma grande variedade de espécies bacterianas incluindo espécies de *Pseudomonas* que não a *P. aeruginosa*. O agar é um agente solidificante.

*b- Armazenamento e estabilidade*

Para fins de transporte, o produto pode permanecer em temperatura ambiente por até 72h. No laboratório as placas devem ser armazenadas em temperatura de 2 a 8°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 pouca a muita, acumulando água na placa. Recomenda-se guardar as placas com os meios de cultura virados para cima e, quando necessário, desprezar a água acumulada e deixar o meio de cultura estabilizar a temperatura antes de sua utilização.

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 (± 37°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 placas 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;
- Bico de Bunsen;
- Alças bacteriológicas,

**6. PROCEDIMENTO TÉCNICO**

- Retirar o pacote da refrigeração e, em ambiente asséptico, separar as placas a serem usadas, devolvendo o restante ao refrigerador;
- Colocar as placas em estufa bacteriológica entre 35-37°C pelo tempo necessário para adquirirem esta temperatura, ou deixar estabilizar/secar em temperatura ambiente;
- Usando procedimentos adequados, proceder a inoculação do material diretamente na superfície do meio;
- Incubar por período de tempo exigido pela técnica adotada.
- Realizar leitura.

**7. RESULTADOS**

Colônias que são circundadas por um pigmento azul-esverdeado e fluorescem sob um comprimento de onda curto (254 nm), a luz ultravioleta pode ser presumivelmente identificada como *Pseudomonas aeruginosa*. No entanto, certas cepas de *P. aeruginosa* podem não produzir piocianina. Outras espécies de *Pseudomonas* não produzem piocianina, mas fluorescem sob luz UV. A maioria das espécies não-*Pseudomonas* é inibida e algumas espécies de *Pseudomonas* também podem ser inibidas. Coloração de Gram, testes bioquímicos e procedimentos sorológicos devem ser realizados para confirmar os achados.

**OBS:**

- Ocasionalmente, alguns microrganismos entéricos exibem um ligeiro amarelamento do meio, no entanto, essa coloração é facilmente distinguida da produção de fluoresceína, uma vez que esse amarelamento não fluoresce.
- Alguns não-fermentadores e alguns esporo formadores aeróbicos podem exibir uma pigmentação marrom-bronzeada solúvel em água neste meio.
- As cepas de *Serratia* podem exibir uma pigmentação rosa.
- Estudos de Lowbury e Collins mostraram que *P. aeruginosa* pode perder sua fluorescência sob luz UV se as culturas forem deixadas à temperatura ambiente por um curto período de tempo. A fluorescência reaparece quando as placas são reincubadas.

**8. LIMITAÇÕES DO MÉTODO**

(Riscos Residuais Identificados conforme RDC 830/2023)

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. Placas com uma carga bacteriana mais carregada podem fornecer 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.

**9. CONTROLE DA QUALIDADE**

- *Materiais necessários*

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

- *Controle de qualidade recomendado:*

Parâmetro	Resultado esperado
Produtividade quantitativa <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 9027	PR >= 50 %
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 8739	Inibição do crescimento
Meio não inoculado	Meio sólido levemente opaco, com coloração âmbar clara, podendo apresentar finos precipitados.

- *Periodicidade*

Testar a cada novo lote recebido ou em periodicidade estabelecida pelo próprio laboratório.

- *Análise dos resultados*

As cepas inoculadas no material devem apresentar características de crescimento esperados. Caso se constate algum problema ou diferença, os resultados de amostras clínicas não devem ser liberados até que as causas tenham sido apuradas devidamente e os problemas constatados sanados.

**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**

1. Arruda, E. A. G. Infecção hospitalar por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: análise epidemiológica no HC-FMUSP. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2009.
2. Blondel-Hill, Henry and Speert. In Murray, Baron, Jorgensen, Landry and Pfaller (eds.), Manual of clinical microbiology, 9th ed. American Society for Microbiology, Washington, 2007.
3. Difco Manual, 2<sup>nd</sup> edition 2009.
4. Farmacopéia Brasileira, 5ª edição. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, 2010.
5. Forbes, Sahm, and Weissfeld. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 12th ed. Mosby Elsevier, St. Louis, Mo., 2007.
6. Forestier C, Guelon D, Cluytens V, Gillart T, Sirof J, de Champs C. Oral probiotic and prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infections: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study in ICU-patients. Crit Care. 2008.
7. Gilardi. In Balows, Hausler, Herrmann, Isenberg and Shadomy (eds.), Manual of clinical microbiology, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, 1991.
8. Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare. 2006. The Japanese pharmacopoeia, 15th ed.
9. Koneman, Elmer; *et al.* Diagnostic Microbiology. Lippincott, USA, 5th ed., 1997.
10. MacFaddin. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, 1985.
11. Mahon, Connie, Manuselis, George Jr. Diagnostic Microbiology. Saunders, USA, 1995.
12. Murray, P.R. *et al.* Manual of Clinical Microbiology. 7th ed, American Society for Microbiology 1999.



**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 041 36619000  
www.laborclin.com.br  
**Responsável Técnico:**  
Maire Wakamori – CRF/PR-20176  
Serviço de Assessoria ao Cliente  
SAC 0800-0410027  
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)

