

Finalidade:

Meio enriquecido, não seletivo e diferencial para caracterização de *Listeria* spp. através do teste de atividade hemolítica e CAMP Test, seguindo as indicações da ISO 11290. E identificação bioquímica de *B. cereus* seguindo indicações da ISO 7932.

Registro ANVISA:

Não aplicável

Apresentação:

540204 - SANGUE-AGAR-SEG.ISO-20mL-PL 90X15-PC10PL

LB 172195
Rev 05 – 09/2024

1. INTRODUÇÃO

O meio de cultura ágar sangue de carneiro proporciona o crescimento da grande maioria das bactérias Gram positivas e Gram negativas bem como de fungos (bolores e leveduras), a partir de uma base rica e suplementada, oferecendo ótimas condições de desenvolvimento para microrganismos não fastidiosos.

O Ágar Sangue Segundo ISO é utilizado no isolamento, cultivo e detecção de atividade hemolítica de *B. Cereus* e *Listeria monocytogenes*, bem como outros microrganismos fastidiosos. O produto também é utilizado no CAMP Test, que é um teste opcional para *Listeria monocytogenes*, ISO 12290:2017.

A conservação dos eritrócitos íntegros favorece a formação de halos de hemólise nítidos, facilitando a diferenciação de algumas espécies hemolíticas.

O CAMP Test, desenvolvido por Christie, Atkins e Munch-Peterson, 1944, baseia-se na beta hemolisina (beta toxina) secretada pelo *Staphylococcus aureus* que reage frente à proteína denominada fator Camp (N-acetil-esfingosina), na intersecção dos dois fatores hemolíticos o processo de hemólise se intensifica, hemólise sinérgica, formando um halo de alta hemólise normalmente em forma de flecha.

O meio de cultura Ágar Sangue ISO contém peptona de caseína e extrato de levedura que fornecem nitrogênio, carbono, aminoácidos e vitaminas. Proteoma peptona é a fonte de nitrogênio para o sangue. O equilíbrio osmótico é mantido pela concentração de cloreto de sódio e o ágar utilizado como agente solidificante. A suplementação com sangue de carneiro desfibrinado a 5% é um fator de crescimento para microrganismos fastidiosos, como por exemplo, o *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*, entre outros microrganismos, sendo a base para determinar os padrões de hemólise.

2. COMPOSIÇÃO

Formulação	Concentração/ L
Digestão enzimática de tecido animal	15g
Digestão Fígado	2,5g
Extrato de Levedura	5g
Cloreto de Sódio	5g
Agar	9g a 18g
Água Deionizada	1L
Sangue Desfibrinado	50mL
pH 7,4± 0,2 a 25°C	

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

3. AMOSTRAS

a- Tipos de amostras

- Vários tipos de amostra podem ser inoculados no Sangue Ágar Segundo ISO.

- 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- 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 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 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 ($\pm 37^{\circ}\text{C}$) 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 à 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.

b- Precauções e cuidados especiais

- O produto 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;
- O procedimento de descarte do produto se baseia na RDC 222 (ANVISA) de 28 de março de 2018, que regulamenta as boas práticas de gerenciamento dos resíduos de serviços de saúde.
- Para acondicionamento e descarte do material usado, autoclavar a 121°C por 20 minutos. Recomendamos o uso dos sacos DetriLab.
- Contate o serviço de vigilância sanitária de sua região para garantir o cumprimento correto da legislação de descarte de produtos potencialmente contaminantes.

5. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS (porém não fornecidos)

- Estufa bacteriológica;
- Alças bacteriológicas;
- Bico de Bunsen;
- Sistema de geração de CO₂;
- Jarra hermeticamente fechada para tensão de CO₂;
- Cepa *Staphylococcus aureus* beta-hemolítico (ATCC 25923 ou ATCC 49444);
- Cepa *Rhodococcus equii* (ATCC 6939).

6. PROCEDIMENTO TÉCNICO

6.1 Atividade Hemolítica

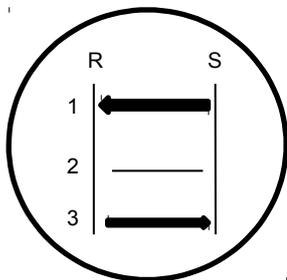
- Retirar o pacote de placas da geladeira e separar as placas a serem usadas, retornando o pacote à geladeira;
- Colocar as placas em estufa bacteriológica entre 35-37°C pelo tempo necessário para adquirirem esta temperatura;
- Inocular as colônias, transferindo o inóculo para um único ponto do meio, por simples contato.
- Incubar o material em estufa bacteriológica pelo período tecnicamente indicado.

Nota: Se necessário utilizar incubador para obter tensão de CO₂;

- Após a incubação, verificar o crescimento e a ocorrência de um halo claro de hemólise ao redor das colônias.

6.2 CAMP Test

- Retirar o pacote de placas da geladeira e separar as placas a serem usadas, retornando o pacote à geladeira;
- Colocar as placas em estufa bacteriológica entre 35-37°C pelo tempo necessário para adquirirem esta temperatura;
- Inocular uma cultura β-hemolítica de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 ou 49444) e uma cultura de *Rhodococcus equii* (ATCC 6939). Cada cultura deve ser inoculada em uma única estria, mantendo as duas estrias paralelas entre si.
- No espaço entre as estrias de *S. aureus* e *R. equii*, inocular uma única estria de cada cultura suspeita, perpendicular às outras duas, porém, sem tocá-las, com uma distância de 1 a 2 mm.
- Várias amostras podem ser estriadas na mesma placa.



Legenda:

- R - *Rhodococcus equii*
- S - *Staphylococcus aureus*
- 1- *Listeria monocytogenes*
- 2- *Listeria innocua* (sem hemólise)
- 3- *Listeria ivanovii*

- Incubar o material em estufa bacteriológica pelo período tecnicamente indicado.

7. RESULTADOS

7.1 Atividade hemolítica

Observar se há formação de um halo claro de hemólise ao redor das colônias (teste positivo).

- *B. cereus* são fortes hemolíticos, produzindo halos grandes e bem nítidos, enquanto *B. mycoides* e *B. thuringiensis* são fracamente hemolíticos, produzindo halos menores ou, eventualmente, zona de hemólise restrita à região sob a colônia. As cepas de *B. anthracis* geralmente não são hemolíticas.
- *L. monocytogenes* formam halos discretos, que não se estendem muito para fora da região da colônia, enquanto *L. ivanovii* forma halos grandes e bem definidos e a *L. innocua* não apresenta hemólise. Resultados duvidosos podem ser esclarecidos pelo CAMP Test.

7.2 CAMP Test

- *L. monocytogenes* produzem uma reação de hemólise discreta, porém, nas proximidades da estria de *S. aureus*, o halo torna-se maior e mais nítido. A atividade hemolítica estende-se apenas até 2mm da cepa de *S. aureus*, dentro da zona fracamente hemolítica devido ao crescimento da cepa.

- *L. seeligeri* apresenta reação semelhante à de *L. monocytogenes*.

- *L. ivanovii*, ao contrário, apresentam halo mais nítido nas proximidades da estria de *R. equii*. Onde a reação positiva é observada como uma grande seta de hemólise (5mm a 10mm).

- As outras espécies de *Listeria* não são hemolíticas e não reagem nesse teste, por exemplo, *L. innocua*.

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 sementeira 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.
- Utilização de agulha flambada não resfriada.
- 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.

9. CONTROLE DE QUALIDADE

- *Materiais necessários*

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

- Controle de qualidade recomendado:

Parâmetros	Resultado esperado	
Produtividade semi-quantitativa - <i>L. monocytogenes</i> 7644	6 – 16 IC	33-37°C/48h

Produtividade Qualitativa - <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	Crescimento Bom	33-37°C/48h
Meio não inoculado	Meio sólido opaco, com coloração vermelho vivo homogêneo, livre de precipitados ou partículas visíveis, podendo apresentar pequenos coágulos isolados.	

- Periodicidade

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

- Análise dos resultados

O meio Sangue ISO Agar testado com cepas padrão deve expressar os resultados esperados. Caso se constate algum problema, os resultados 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. 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. 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 BIBLIOGRÁFICAS

1. APHA: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 5th ed. American Public Health Association, Washington, D.C., 2015.
2. Difco Manual, edition 2009.
3. ISO 7932. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* - Colony-count technique at 30°C., 2004.
4. ISO 11133. Microbiology of food, animal feed and water - Preparation, production, storage and performance testing of culture media. 1st ed. The International Organization for Standardization, 2014.
5. ISO 11290-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria*

monocytogenes - Part 1: detection method, 1st ed. The International Organization for Standardization, 2017.

6. McLAUCHLIN, J. & REES, C.E.D., 2009. Genus I *Listeria* Pirie 1940. In: DeVOS, P., GARRITY, G.N., JONES, D. *et al.* (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., volume 3. New York: Springer.

7. SILVA, de Neusely; *et al.* Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água, 5^a ed. São Paulo: Blucher, 2017.



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

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 in vitro.
	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)