

Finalidade:

O ágar Columbia CNA é um meio enriquecido e seletivo para cultivo de bactérias gram-positivas não exigentes e exigentes oriundas de amostras clínicas.

Registro ANVISA:

10097010137

Apresentação:

540178 - SANGUE-AGAR-COL.-CNA-20mL-PL90X15-10PL

LB 172252
Rev. 07 – 09/2024

1. INTRODUÇÃO

Ellner *et al.* em 1966 referiram o desenvolvimento de uma nova formulação de ágar sangue, nomeada como ágar Columbia. As propriedades para suportar um crescimento superior do ágar Columbia com sangue de carneiro a 5% derivam da combinação de duas peptonas com extrato de levedura como uma fonte de vitaminas de complexo B. O amido fornece uma fonte de carbono e o cloreto de sódio mantém o equilíbrio osmótico. Com a inclusão de amido de milho para absorver os subprodutos tóxicos contidos nas amostras e funcionando como uma fonte de energia para os organismos que possuem alfa-amilases. O sangue de carneiro permite a detecção de reações hemolíticas e fornece o fator X (heme) necessário para o crescimento de muitas espécies patogênicas. As colônias desenvolvidas em ágar Columbia tendem a ser maiores e crescendo de forma mais exuberante do que nos meios que contêm outras bases de ágar. O ágar Columbia é recomendado como um meio de isolamento primário nas normas de MiQ e manuais de diagnóstico. Em muitos países europeus, este meio se tornou a opção de isolamento primário mais utilizado para as amostras clínicas. Em sua maioria, os meios contendo ágar sangue são relativamente livres de açúcares redutores, o que tem sido reportado, em literatura, como uma influência negativa nas reações hemolíticas de *Streptococcus* β -hemolítico. A suplementação com sangue (5–10%) fornece fatores de crescimento adicionais para microrganismos exigentes e ajuda na determinação das reações hemolíticas.

2. COMPOSIÇÃO

Formulação	Concentração/L
Hidrolisado pancreático de caseína	12,0
Peptona de carne	5,0
Extrato de Levedura	3,0
Extrato de carne bovina	3,0
Amido de milho	1,0
Cloreto de sódio	5,0
Ágar Base	13,5
Ácido Nalidíxico	0,015
Colistina	0,01
Sangue de carneiro desfibrinado	5%
Água deionizada	1L
pH 7,3 \pm 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 utilizadas amostras clínicas como: urina, secreções, sangue e outros fluídos corpóreos, materiais biológicos diversos, amostras ambientais ou quaisquer outras amostras passíveis de conter os microrganismos com capacidade de se desenvolver neste produto.
- 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

Placas contendo ágar sangue de carneiro 5% (o volume de sangue é ajustado conforme o VG (volume globular) a 56°C de temperatura), adicionados antimicrobianos colistina e ácido nalidíxico para inibição de bacilos gram negativos.

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 (\pm 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 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 do material a ser autoclavado, recomendamos o uso dos sacos para autoclavagem - 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;
- Incubadores (para incubar com tensão de CO₂);
- Geradores de ambiente.

6. PROCEDIMENTO TÉCNICO

a- Retirar o pacote da refrigeração e, em ambiente asséptico, separar as placas a serem usadas, devolvendo o restante ao refrigerador;

b- Colocar as placas em estufa bacteriológica entre 35-37°C pelo tempo necessário para adquirirem esta temperatura, ou deixar estabilizar/secar em temperatura ambiente;

c- Usando procedimentos adequados, proceder a inoculação do material diretamente na superfície do meio;

d- Incubar o material em estufa bacteriológica entre 35-37°C/18-24h. A utilização de geradores de ambiente (CO₂, anaerobiose ou microaerofilia) é fundamental para o desenvolvimento de microrganismos neste meio de cultura, devendo se utilizar o ambiente correto para a bactéria alvo. Consulte a literatura para verificar a classificação dos microrganismos quanto à necessidade de ambiente controlado.

e- Após a incubação, verificar o crescimento e a ocorrência de hemólise se for o caso (evidenciada através da visualização de um halo ao redor da colônia);

f- Devido a exigências especiais, alguns microrganismos podem necessitar de um período maior de incubação, se não ocorrer o crescimento nas primeiras 24 horas, ou caso o crescimento apresentado não seja o suficiente, incubar o material sob tensão de CO₂ em estufa bacteriológica entre 35-37°C, por mais 18-24h;

g- Após o total desenvolvimento das colônias, proceder com os processos de identificação conforme estabelecido em seu laboratório;

h- A avaliação microscópica de colorações de Gram da amostra e, se necessário, da colônia analisada pode elucidar dúvidas e oferecer um melhor direcionamento para o processo de identificação.

7. RESULTADOS

Relatório

- Não houve crescimento:
"Ausência de crescimento microbiano na amostra analisada após 24/48h de incubação a 35°C";
- Havendo crescimento:
"Nome do microrganismo (indicar bactéria identificada)
Contagem de colônias (indicar resultado) UFC/mL" (apenas quando aplicável)

Morfologias típicas das colônias em ágar Columbia CNA:

Microrganismo	Morfologia
<i>Haemophilus influenzae</i>	Dimensões pequenas (1 mm), úmidas, aspecto de pérola e odor característico, crescimento reduzido quando comparado ao ágar Chocolate suplementado.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Dimensões pequenas (1 a 2 mm), de incolores a brancas acinzentadas e mucoides, crescimento reduzido quando comparado ao ágar Thayer-Martin.
<i>Neisseria meningitidis</i>	Dimensões de médias a grandes (2 a 8 mm), incolores a levemente cinzas, por vezes apresentam uma tonalidade azulada, mucoides, crescimento reduzido quando comparado ao ágar Chocolate suplementado.
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Colônias redondas, convexas, opacas, dimensões pequenas (1 a 3 mm), colorações variando entre cinza claro a levemente esverdeado, quando tocadas deslizam sobre o meio de cultura permanecendo intactas, crescimento de bom a ótimo quando comparado a outros meios de cultura.
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Colônias baixas, de dimensões pequenas (1 a 3 mm), habitualmente brilhantes, com coloração esverdeada, apresenta α-hemólise na maioria das amostras, crescimento de bom a ótimo quando comparado a outros meios de cultura.
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Colônias redondas, de dimensões pequenas (1 a 4 mm), habitualmente brilhantes, com coloração de incolor a branca, apresenta β-hemólise na maioria

	das amostras, crescimento ótimo a excelente quando comparado com outros meios de cultura.
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Colônias redondas, de dimensões pequenas (1 a 2 mm), habitualmente opacas, por vezes achatadas, com coloração de incolor a branca, apresenta β-hemólise na maioria das amostras, crescimento ótimo a excelente quando comparado com outros meios de cultura.
Estreptococos (não pertencentes ao grupo D)	Colônias de pequena dimensão (1 a 3 mm), brancas a acinzentadas. Hemólise beta ou alfa, crescimento ótimo a excelente quando comparado com outros meios de cultura.
Enterococos (Grupo D)	Colônias pequena dimensão, mas maiores do que os estreptococos do grupo A ou B (2 a 4 mm), de brancas a acinzentadas. Hemólise alfa (raramente beta), crescimento ótimo a excelente quando comparado com outros meios de cultura.
<i>Staphylococcus spp.</i>	Colônias de média a grande dimensão (4 a 10 mm), brancas a cinzentas ou creme a amarelas, com ou sem hemólise, crescimento ótimo a excelente quando comparado com outros meios de cultura.
Corinebactérias	Colônias de pequena a grande dimensão (2 a 10 mm), brancas a cinzentas ou amarelas, com ou sem hemólise, crescimento de bom a ótimo quando comparado a outros meios de cultura
<i>Listeria monocytogenes</i>	Colônias de pequena a média dimensão (2 a 5 mm), acinzentadas, com betahemólise fraca, crescimento de bom a ótimo quando comparado a outros meios de cultura.
<i>Candida spp.</i>	Colônias de pequena a grande dimensão (2 a 12 mm), brancas, podendo ser inibidas total ou parcialmente se sensíveis aos inibidores.
Enterobactérias	Inibição parcial a total de todas as cepas Gram negativas que apresentem sensibilidade aos inibidores utilizados na formulação.

8. LIMITAÇÕES DO MÉTODO

(Riscos Residuais Identificados conforme RDC 830/2023)

- A utilização de suplementos químicos delicados e antibióticos na formulação podem acarretar leve foto sensibilidade, recomenda-se proteger o produto da incidência direta da luz.
- A utilização de ácido Nalidíxico e Colistina como inibidores de crescimento de flora Gram negativa apresenta eficácia superior à 92% para microrganismos da flora intestinal e superior a 96% para microrganismos da flora respiratória. Para casos que apresentem crescimento de microrganismos resistentes aos inibidores, recomenda-se o reisolamento específico das colônias de interesse para a obtenção de uma cultura livre de interferentes.
- Algumas variações de coloração na colônia, morfologia, tamanho ou intensidade de hemólise pode ocorrer, devido a características únicas da cepa analisada.
- A presença de mais de uma variante genética intrínseca a cepa analisada, pode interferir nas características de crescimento. É possível que características únicas ou mutadas das cepas possam interferir no desempenho do meio de cultura afetando ou retardando o total desenvolvimento das colônias.
- Inóculos com excesso de carga bacteriana podem interferir na avaliação de resultados.
- A presença de mais de um microrganismo na amostra pode ocasionar sobreposição de colônias na superfície do meio de cultura, dificultando sua identificação, para estes casos, recomenda-se o reisolamento das colônias diferentes, mantendo a contagem da placa inicial.
- Devido a carga de inibidores utilizados na composição deste produto, podem ocorrer hemólises tardias ou em quantidade menor, no isolamento de cepas hemolíticas, em algumas variantes genicas.
- A incubação em tensão de CO₂ reduz esta possibilidade.
- A qualidade dos resultados de análises microbiológicas são intimamente ligada a qualidade da amostra, as melhores práticas pré-analíticas, como cuidados extremos com a assepsia do processo ou paciente, garantem um melhor resultado.
- Embora possam ser realizados alguns testes de diagnóstico diretamente neste meio de cultura, é necessária a realização de

testes bioquímicos para uma completa identificação e, se indicado, a realização de testes imunológicos usando culturas puras. Consultar a bibliografia apropriada para mais informações.

Riscos residuais identificados:

- Os resultados falso-negativos podem ocorrer, com maior frequência, nas seguintes situações:

- Técnica de coleta inadequada
- Incubação sem tensão de CO₂
- Incubação em temperatura inadequada
- Uso de antimicrobiano prévio
- Utilização de alça flambada não resfriada
- Tempo de incubação insuficiente
- Infecção crônica (infecção pouco ativa)
- Armazenamento ou transporte de amostra inadequado
- Agentes etiológicos exigentes com relação aos meios de cultura
- Necessidade de meios especiais para o crescimento de um agente infeccioso específico

- Os resultados falso-positivos podem ocorrer, com maior frequência, nas seguintes situações:

- Técnica de assepsia inadequada
- Erro na conservação do material
- Tempo longo entre a coleta e análise
- Tempo excessivo de incubação
- Interpretação equivocada de colônias não patogênicas
- Utilização de material vencido, contaminado ou em condições inadequadas
- Contaminação cruzada por uso de acessórios não esterilizados corretamente ou ambiente não asséptico

9. CONTROLE DA QUALIDADE

- **Materiais necessários**

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

- **Controle de qualidade recomendado:**

Cepas	Resultado esperado
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC® 25933	Inibição total
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	Crescimento bom – presença de hemólise
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC® 19615	Crescimento bom – hemólise ausente
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 49619	Crescimento bom – presença de α-hemólise

- **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.

- **Sensibilidade**

- Este produto apresenta sensibilidade ≥ 99,0% e especificidade ≥ 99,7% frente aos principais microrganismos não fastidiosos.

Microrganismo	Sensibilidade % (Intervalo de confiança de 95%)	Especificidade % (Intervalo de confiança de 95%)
<i>Enterococcus faecalis</i>	111/112 99.1% (98.3 – 99.9%)	216/216 100.0% (99.8 – 100%)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	94/95 99.1% (91.9 – 99.7%)	119/120 99.2% (98.3 – 100%)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	140/143 97.9% (95.1 – 99.1%)	220/221 99.6% (96.7 – 100%)

<i>Staphylococcus aureus</i>	161/161 100.0% (97.2 – 100%)	265/265 100% (96.9 – 100%)
------------------------------	--	--------------------------------------

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

1. Baron, E. J, L. R. Peterson, and S. M. Finegold. 1994. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 9th ed., p. 415. Mosby-Year Book, Inc. St. Louis, MO.
2. Bisno, A.L. Acute pharyngitis. N Engl J Med, 344(3): 205–211, 2001.
3. Chapin, K.C., and T.-L. Lauderdale. 2003. Reagents, stains, and media. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
4. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Princípios Éticos na Experimentação Animal. 03 Março 2000.
5. Difco Manual, 2º ed., 2009.
6. Dunne Jr. W.M., Nolte, F.S. and Wilson, M.L. Blood Culture III. CUMITECH 1B. Coord. Ed. J.A. Hindler, American Society for Microbiology, Washington, DC, 1997.
7. Ellner, P.D., C.J. Stoessel, E. Drakeford, and F. Vasi. 1966. A new culture medium for medical bacteriology. Am. J. Clin. Pathol. 45: 502-504.
8. Eschenbach, D.A., Pollock, H.M. and Schachter, J. Laboratory diagnosis of female genital tract infection. CUMITECH 17. Coord. Ed. S.J. Rubin. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1983.
9. Isenberg, H. D. (ed.). 1992. Interpretation of aerobic bacterial growth on primary culture media, Clinical microbiology procedures handbook, vol.1, p. 1.6.1-1.6.7. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
10. Koneman, Elmer; et al. Diagnostic Microbiology. Lippincott, USA, 6 ed., 2010.
11. MacFaddin, J. F. 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol. 1, p. 86-92. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
12. MiQ - Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik, edited by Mauch, H., R. Lüttiken, and S. Gatermann for the Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM). Volumes 3, 6, and 7. Urban & Fischer, Munich, Germany.
13. Murray, P.R. et al. Manual of Clinical Microbiology. 7th ed, American Society for Microbiology 1999.
14. Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.).2003. Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
15. Reller, R.B., Murray, P.R. and MacLowry, J.D. Blood Culture II. CUMITECH 1A. Coord. Ed. J.A. Washington II, American Society for Microbiology, Washington, DC, 1982.
16. Russell FM et al. As a Bacterial Culture Medium, Citrated Sheep Blood Agar Is a Practical Alternative to Citrated Human Blood Agar in Laboratories of Developing Countries. Journal of Clinical Microbiology, 44: 3346–3351, set. 2006.

- Satzke C et al. Comparison of Citrated Human Blood, Citrated Sheep Blood, and Defibrinated Sheep Blood Mueller-Hinton Agar

Preparations for Antimicrobial Susceptibility Testing of Streptococcus pneumoniae Isolates. Journal of Clinical Microbiology, 48: 3770-3772, out. 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

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)