

Finalidade:

Meios enriquecidos, não seletivos e diferenciais em uma única placa, para cultivo de bactérias sensíveis e exigentes.

Registro ANVISA:

10097010137

LB172295
Rev. 02 – 08/2024

Apresentação:

540260 - BIPLACA-SANGUE/CHOCOLATE-10/10mL-PC 10PL

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.

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

O ágar chocolate consiste em um meio enriquecido com suplemento VX de forma a favorecer o crescimento de diversos patógenos fastidiosos como *Haemophilus* spp. e *Neisseria* spp. isolados de materiais clínicos nobres (LCR, aspirados invasivos), ou não (sangue, secreções), entre outros. A adição de bacitracina no meio, facilita o desenvolvimento de espécies como *Haemophilus* spp., promovendo leve inibição a alguns microrganismos da microbiota normal. Indicado para a pesquisa clínica de microrganismos fastidiosos em amostras de origem nobre e em amostras de secreções.

2. COMPOSIÇÃO

Formulação Ágar Sangue *	g/L
Hidrolisado pancreático de caseína	12.0
Hidrolisado péptico de tecido animal	5.0
Extrato de leveduras	3.5
Extrato de bovino	3.0
Amido de milho	1.0
Cloreto de sódio	5.0
Ágar Base	15.0
Sangue de carneiro desfibrinado	5%
Água deionizada	1L
pH 7.3 ± 0.2 a 25°C	

Formulação Ágar Chocolate *	g/L
Hidrolisado pancreático de caseína	7.5
Peptona de carne	7.5
Fosfato dipotássio	4.0
Fosfato monopotássico	1.0
Amido de milho	1.0
Cloreto de sódio	5.0
Ágar Base	13.0
Hemoglobina	10.0
Suplemento VX	10 mL
Água deionizada	1L
pH 7.3 ± 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

- Podem ser utilizadas amostras clínicas como: urina, secreções e outros fluidos 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.

b- Precauções e cuidados especiais

- Produto destinado ao uso diagnóstico *in vitro*;

- Não usar materiais com o prazo de validade expirado, ou que apresentem selo de qualidade rompido ou violado.

- Antes de descartar o material usado, autoclavar a 121°C por 20 minutos. Para acondicionamento do material usado, recomendamos o uso do Detrilab.

4. INFORMAÇÕES GERAIS SOBRE O PRODUTO

a- Princípio

Meios de cultura distribuídos a partir de reatores 100% automatizados, garantindo total esterilidade do processo, correta homogeneização e volumes precisos de componentes das fórmulas, em placas irradiadas por radiação γ (*gamma*), garantindo o melhor desempenho do produto.

Placas contendo partições com:

- Ágar sangue de carneiro 5%;

- Ágar Chocolate Enriquecido, formulado com ágar base BHI, sangue de carneiro desfibrinado, adicionado a 56°C com posterior elevação a 70°C, e enriquecimento com Suplemento VX.

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 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°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.

Devido à presença de hemácias íntegras e sensíveis suplementos químicos, 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 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;
- 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 sob tensão de CO₂ em estufa bacteriológica entre 35-37°C/18-24h;

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.

Morfologias típicas das colônias em ágar sangue:

Microrganismo	Características
---------------	-----------------

<i>Staphylococcus aureus</i>	Colônias grandes, opacas, cremosas com borda circular, elevação convexa, de coloração branca ou amarela, em geral β-hemolíticas.
<i>Staphylococcus coagulase negativo</i>	Colônias médias, opacas, cremosas com borda circular, elevação convexa, de coloração branco-acinzentado, não hemolítico.
<i>Streptococcus</i> grupo <i>viridans</i>	Colônias pequenas, translúcidas, cremosas com bordas pontiformes, de coloração branco-acinzentadas, elevação achatadas, α-hemolíticas.
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Colônias médias, circulares, translúcidas com borda circular, elevação convexa, de coloração cinza, em geral β-hemolíticas (aprox. 11% não apresentam hemólise).
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Colônias pequenas, puntiformes, translúcidas, elevação convexa, de coloração cinza, β-hemolíticas.
<i>Streptococcus anginosus</i>	Colônias pequenas, puntiformes, translúcidas, elevação convexa, de coloração cinza, β-hemolíticas.
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Colônias pequenas, com borda circular, transparentes, elevação umbilicada ou achatada, de coloração cinza, α-hemolíticas.
<i>Enterococcus</i> spp.	Colônias médias, com borda circular, opacas e elevadas, de coloração cinza, em geral não hemolíticas.
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Colônias grandes, com borda circular, opacas e com elevação domo, de coloração "café com leite", secas, não hemolíticas e que se desprendem por inteiro do meio.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Colônias pequenas, com borda circular, translúcidas e brilhantes, elevadas, de coloração cinza, não hemolíticas.
<i>Listeria monocytogenes</i>	Colônias pequenas translúcidas com pequenas zonas de beta-hemólise.

Morfologias típicas das colônias em ágar Chocolate:

Microrganismo	Morfologia
<i>Haemophilus influenzae</i>	Dimensões pequenas (1 mm), úmidas, aspecto de pérola e odor característico
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Dimensões pequenas (1 a 2 mm), de incolores a brancas acinzentadas e mucóides
<i>Neisseria meningitidis</i>	Dimensões de médias a grandes (2 a 8 mm), incolores a levemente cinzas, por vezes apresentam uma tonalidade azulada, mucóides
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Colônias baixas, de dimensões pequenas (1 a 3 mm), habitualmente brilhantes, com coloração esverdeada
<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

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).

8. LIMITAÇÕES DO MÉTODO

(Riscos Residuais Identificados conforme RDC 830/2023)

- A utilização de sangue e suplementos químicos delicados na formulação pode acarretar leve foto sensibilidade, recomenda-se proteger o produto da incidência direta da luz.

- Uma vez que este meio não é seletivo, outros agentes patogênicos, ou não, irão se desenvolver. Para casos que

apresentem crescimento de múltiplos microrganismos, recomenda-se a utilização de meios seletivos para um melhor isolamento.

- 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 da cepa 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 isolamento das colônias diferentes, mantendo a contagem da placa inicial.

- A formulação dos meios prevê a utilização de geradores de ambiente para o correto desenvolvimento de microrganismos, a incubação sem a correta tensão de CO₂, por exemplo, pode ocasionar diminuição nas dimensões das colônias ou retardo no crescimento.

- A utilização de métodos adaptados para a geração de ambiente, como velas (±3% de CO₂), esponja de aço e antiácido efervescente (±7% de CO₂), por exemplo, não garantem o ambiente ideal para o crescimento correto de todos os microrganismos de interesse possíveis.

- A qualidade dos resultados de análises microbiológicas é intimamente ligada à 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 para Ágar Sangue:*

Parâmetro	Incubação	Resultado esperado
-----------	-----------	--------------------

Produtividade qualitativa - <i>S. aureus</i> ATCC® 25923	33-37°C / 24h	Crescimento bom – presença de β-hemólise
Produtividade qualitativa - <i>S. pneumoniae</i> ATCC® 49619	33-37°C 24h	Crescimento bom – presença de α-hemólise (Jarra)
Produtividade qualitativa <i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 29212	33-37°C 24h	Crescimento bom – sem hemólise
Meio não inoculado	Meio sólido opaco, vermelho homogêneo, com pequenos coágulos isolados.	

- *Controle de qualidade recomendado para Ágar Chocolate:*

Parâmetro	Incubação	Resultado esperado
Produtividade qualitativa - <i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC® 43069	33-37°C / 18-48h	Crescimento bom
Produtividade qualitativa - <i>Haemophilus influenzae</i> ATCC® 49247	33-37°C / 18-48h	Crescimento bom
Meio não inoculado	Meio sólido opaco, marron homogêneo, livre de precipitados	

* As cepas sugeridas atendem as recomendações literárias, a decisão sobre quais cepas controle serão utilizadas, e como serão empregadas, cabe ao laboratório.

- *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.

- Este produto apresenta sensibilidade ≥ 95,9% e especificidade ≥ 99,5% frente aos principais microrganismos.

Desempenho do ágar Sangue (sob tensão de CO₂):

Microorganismo	Sensibilidade % (Intervalo de confiança de 95%)	Especificidade % (Intervalo de confiança de 95%)
<i>Escherichia coli</i>	423/423 100,0% (99,1 – 100%)	423/423 100,0% (99,8 – 100%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	502/502 100,0% (99,7 – 100%)	701/701 100% (98,9 – 100%)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	264/265 99,6% (97,4 – 99,9%)	307/307 100% (99,3 – 100%)

Desempenho do ágar Chocolate:

Microorganismo	Sensibilidade % (Intervalo de confiança de 95%)	Especificidade % (Intervalo de confiança de 95%)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	108/116 93,1% (84,2 – 89,9%)	207/207 100,0% (99,8 – 100%)

<i>Haemophilus influenzae</i>	83/92 90.2% (89,3 – 98,6%)	117/118 99.2% (98,1 – 100%)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	138/143 96.5% (93,4 – 99,1%)	206/207 99.5% (96,3 – 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. Association of Official Analytical Chemists. 1995. Bacteriological analytical manual, 8th ed., App. 3.08-3.09. AOAC International, Gaithersburg, MD.
2. 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.
3. Bernstein, J.M. Treatment of community-acquired pneumonia. IDSA Guidelines CHEST, 115:9S-13S, 1999.
4. Chapin, K.C., and T.-L. Lauderdale. 2003. Reagents, stains, and media: bacteriology. 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.
5. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Princípios Éticos na Experimentação Animal. 03 março 2000.
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. Farmer III, J.J. 2003. Enterobacteriaceae: introduction and identification. 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.
10. 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.
11. Jacobs, J.A., De Brauwier, E.I.G.B., Cornelissen, E.I.M. and Drent, M. Accuracy and precision of quantitative calibrated loops in transfer of bronchoalveolar lavage fluid. J Clin Microbiol 38(6):2117-2121, 2000.
12. Koneman, Elmer; et al. Diagnostic Microbiology. Lippincott, USA, 6 ed., 2010.
13. MacFaddin, J.F. 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol. I. Williams & Wilkins, Baltimore.

14. Maki, D.G., Weise, C.E. and Sarafin, H.W. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter related infection. N Engl J Med, 296:1305-1309, 1977.
15. Mahon, Connie, Manuseles, George Jr. Diagnostic Microbiology. Saunders, USA, 1995.
16. Murray, P.R. et al. Manual of Clinical Microbiology. 7th ed, American Society for Microbiology 1999.
17. NNIS. National Nosocomial Infections Surveillance. MMWR, 49, 8, March 3, 2000.
18. 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.
19. 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.



Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda

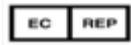
CNPJ 76.619.113/0001-31
Insc. Estadual 1370012926
Rua: Casimiro de Abreu, 521
Pinhais/PR CEP 83.321-210
Telefone: (41) 3661-9000

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)

