

Agar Cromogênico- Mbiolog

Finalidade

Chromogen-Agar Mbiolog é um meio de cultura, diferenciado, que promove a identificação presumida dos principais patógenos que causam a infecção do trato urinário através da detecção, por agentes cromogênicos específicos, da atividade enzimática bacteriana sobre determinados substratos.

Princípio de ação

O meio contém dois substratos cromogênicos específicos que são clivados por enzimas produzidas por *Enterococcus* spp., *Escherichia coli* e coliformes (β -glucuronidase e β -glucosidase). Além disso, contém fenilalanina e triptofano, que promovem a identificação através da atividade da triptofano-desaminase, demonstrando a presença de *Proteus* spp., *Morganella* spp. e *Providencia* spp. Este meio é baseado em ágar CLED, sendo valioso meio para cultura em placa dos demais organismos causadores de infecções do trato urinário, também prevenindo o aparecimento do véu de *Proteus* spp.

Composição

Extrato de carne	3,0 g/L
Peptonas	10,0 g/L
L-cistina	0,13 g/L
Extrato de levedura	1,0 g/L
Substratos	0,2g/L
Ágar	16,7 g/L
Água destilada	q.s.p.
pH final	6,8 \pm 0,2

Materiais necessários não fornecidos

Bico de Bunsen ou câmara de fluxo laminar

Estufa bacteriológica

Alças de platina ou descartável.

Armazenamento e transporte do produto

As datas de fabricação e validade aparecem no rótulo da embalagem. Não usar produtos cuja data de validade tenha expirado.

1. Meio de cultura pronto para uso em placa de Petri.

Deve ser mantido sob refrigeração, entre 2 e 8°C, embalados em sacos plásticos e acondicionados em posição invertida (tampa voltada para baixo) de forma a se evitar a desidratação precoce do produto. Quando obedecidas essas condições de armazenamento, o meio de cultura mantém-se adequado para uso até a data de validade expressa na placa.

As placas não deverão ser excessivamente expostas à luz, pois poderá ocorrer degradação dos substratos cromogênicos.

2. Meio de cultura desidratado em frascos

As embalagens devem ser mantidas em temperaturas entre 2 e 30°C, ao abrigo da luz, umidade e fontes de calor. Quando obedecidas essas condições de armazenamento, o meio de cultura em frascos mantém-se adequado para uso até a data de validade expressa no rótulo.

Precauções e cuidados especiais

1. Meio de cultura pronto para uso em placa de Petri.

Somente para uso diagnóstico "in vitro".

Usar luvas descartáveis quando manusear amostras.

Não comer, beber, fumar, armazenar ou preparar alimentos, ou aplicar cosméticos dentro da área de trabalho onde reagentes e amostras estiverem sendo manuseados.

A manipulação das placas só deve ser realizada próxima à chama ou sob fluxo laminar, de forma a se evitar a contaminação do meio de cultura, evidenciada pelo crescimento espúrio de microorganismos.

Verificar, antes de realizar o inóculo da amostra, a superfície e as características do meio de cultura. Este deve se apresentar liso, homogêneo, isento de rachaduras, bolhas, e grumos. A constatação de qualquer uma destas irregularidades demonstra a inadequação do meio de cultura para uso.

De igual importância, a verificação do meio no que se refere à presença de colônias oriundas de agentes contaminantes também deve ser realizada. A constatação de crescimentos acarreta no descarte do material, por este ser impróprio para uso.

Todas as placas, bem como todo o material utilizado no processo de análise, devem, obrigatoriamente ser autoclavados a 121°C, 1 atm, durante 15 a 20 minutos, antes de seu descarte final.

2. Meio de cultura desidratado em frascos

Manter os frascos de meio de cultura sob condições ideais de armazenamento já descritas.

Assegurar-se de que após o uso o frasco esteja bem fechado.

Usar água destilada ou deionizada de boa qualidade.

Preparar o meio de cultura em recipiente de volume duas vezes e meia maior que o volume desejado para permitir hidratação, mistura e aeração adequados.

Realizar as provas de controle de qualidade específicas do meio.

Amostra

Urina de jato médio, colhida seguindo criteriosa assepsia e higienização em coletor esterilizado ou recipiente adequado.

As amostras devem ser colhidas seguindo cuidados específicos de forma a se obter representatividade do processo

infeccioso, assepsia na coleta da amostra e sem interações medicamentosas.

Não é aconselhado o armazenamento da amostra. Em casos extremos, em que não se pode realizar o inóculo imediato, a amostra deve ser conservada sob refrigeração, a 4°C por no máximo 24 horas.

Procedimento

Ler cuidadosamente as instruções desta bula.

1. Meio de cultura pronto para uso em placa de Petri.

Inocular a amostra por estrias através de esgotamento da alça de platina. Obedecer os critérios internos do laboratório acerca das condições de assepsia e esterilidade do local de trabalho.

Incubar a placa inoculada à 37°C por 24 horas.

Após incubação, observar as placas.

2. Meio de cultura desidratado em frascos

Indicado para o preparo de placas de Petri de uso

Dissolver 34,0 g em 1 litro de água destilada. Hidratar por 10 a 15 minutos, **não aquecer**. Esterilizar a 121°C e 1 atm por 15 minutos. Esfriar até 45-50°C. Distribuir 15-20 mL por placa de petri esteril. Se não for usado no mesmo dia, armazenar de 2-8°C em posição invertida.

Interpretação

Não havendo crescimento bacteriano, constata-se amostra isenta de bactérias.

Havendo crescimento bacteriano, realizar a contagem do número de colônias e multiplicar pelo fator de diluição ou pelo volume relativo da alça. Este procedimento visa obter o número de colônias/ml. Após a contagem, identificar presumivelmente

Agar Cromogênico- Mbiolog



o patógeno através da cor da colônia crescida.

Exemplo

nº de colônias contadas: 25
Calibração da alça= $1,0 \cdot 10^{-3}$ mL

nº de colônias/mL= $25 \times 1,0 \cdot 10^3 = 25.000$ colônias/mL

Microorganismo

Enzima

Cor da colônia

1- *Escherichia coli*
(β -glucuronidase +)
Rósea ou branca com centro rosa (BGN , Indol +)

2- *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp e

Serratia spp
(β -glicosidase +)
Azul-esverdeado (colônia grande, BGN)

3- *Enterococcus* spp
(β -glicosidase +)
Verde azulado (colônia pequena, coco Gram +)

4- *Proteus* spp, *Morganella* spp ou

Providencia spp
(*triptofano* *desaminase*)
Marrom ou bege

5- *Staphylococcus saprophyticus*
Rosa, colônia pequena(coco Gram+)

Leveduras , *S.aureus* e *P.aeruginosa*
Pigmentação natural

Valores de referência

Cabe ao laboratório de análises clínicas o estabelecimento de seus próprios critérios de interpretação de resultados, no que concerne à verificação quantitativa de unidades formadoras de colônia da amostra.

Controle de qualidade

O laboratório deve preferivelmente participar de programas de controle externo de qualidade, a exemplo daqueles oferecidos pela SBAC e SBPC.

É recomendado a realização do controle de qualidade através de cepas ATCC de *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* e *Proteus mirabilis*.

Dados estatísticos

Por se tratar de meio de cultura de enriquecimento, não existem formas de se realizar estudos de sensibilidade e especificidade.

Reprodutibilidade e repetitividade: A realização de 20 culturas de uma mesma suspensão de cepa-padrão com valor 0,5McF, em dias alternados, ao longo de 4 dias, demonstrou um coeficiente de

variação igual a 8,25%.

Estabilidade: Quando mantido sob condições ideais de armazenamento, o meio de cultura pronto para uso mantém-se adequado por 03 meses. O meio de cultura desidratado em frascos quando mantido sob condições ideais de armazenamento mantém-se adequado por até 60 meses.

Interferentes

Amostras contaminadas, quando colhidas inadequadamente, ou oriundas de pacientes fazendo uso de antimicrobianos produzem resultados não condizentes com a realidade clínica do paciente. Em casos em que haja suspeita de qualquer destes interferentes na amostra, repetir o exame após saná-los.

Amostras muito contaminadas dificultam a visualização das cores formadas. Sendo assim quando houver crescimento polimicrobiano não predominante, nova amostra (para urocultura) deverá ser solicitada.

Havendo organismos com padrão enzimático atípico, reações anômalas poderão ocorrer. Por exemplo: em um ensaio experimental, uma cepa de *Enterobacter cloacae* demonstrou deficiência da atividade de β -glucosidase, resultando em colônias róseas que são indistinguíveis de *E. coli*. Nestes casos, a diferenciação é realizada através do teste da formação de Indol utilizando DMACA (o reativo de Kovac's não deve ser utilizado, uma vez que a coloração das colônias de *E. coli* interfere na cor vermelha do teste positivo). O reagente não deve ser aplicado diretamente sobre a placa, podendo ser realizado sobre papel filtro. Este teste permite a distinção entre *E. coli* e *Enterobacter* spp, e também entre *Proteus mirabilis* e *Proteus vulgaris*.

Apresentação

1. Meio de cultura pronto para uso em placa de Petri:

Embalagem Nº de culturas

10 placas 10

2. Meio de cultura desidratado em frascos:

Embalagens de 100 e 500g.

Bibliografia

1. Difco & BBL Manual . Manual Of Microbiological Culture Media. Ed., United States of America, 2003.
2. Friedman, M.P. et al (1991) Journal of Clinical Microbiology 29: 2385-2389
3. Koneman, E.W. Trad. Cury, A.E. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 5a. Ed.,

MEDSI, Rio de Janeiro, 2001.

4. Murray, P.R., Baron, J.E., Pfaller, A.M., Tenover, C.F. and Tenover, H.R. Manual of clinical

microbiology. American Society for Microbiology, 7th ed., Washington. DC, 1999.

5. Oplustil, C.P., Zoccoli, C.M., Tobouti, N.R., e Sinto, S.I. Procedimentos Básicos em

Microbiologia Clínica, Sarvier, São Paulo, 2000.

6. Pezzlo, M. (1998) Clinical Microbiology

7. Wilkie, M.E., Almond, M.K., Marsh, E.P. (1992) British Medical Journal 305:1137-1141.

Resp. Técnico: Fabrício Galvão de Brito

Revisão: Junho/2010

Versão: 01

MBiolog Diagnósticos Ltda

Rua Gama, 337 – Vila Paris

Contagem / MG – 32372-120

Tel: (31) 3507-0700

Fax: (31) 3507-0707

sac@mbiolog.com.br

www.mbiolog.com.br