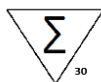
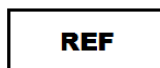


Indicações

Conjunto de Laminocultivo e Caldo enriquecido, sem adição de neutralizadores de antibiótico, destinado à cultura de Sangue, Hemocomponentes, Líquidos Corpóreos e Nutrição Parenteral.

Apresentação

HATEF e HPTEF



Caixa contendo 30 frascos de Laminocultivos e 30 frascos com caldo enriquecido, nas apresentações Adulta (45 mL) ou Pediátrica (30 mL).

Composição

Laminocultivo: Face larga; Agar Chocolate suplementado, Face dividida direita; Agar MacConkey, Face dividida esquerda; Agar Sabouraud e Água Purificada.

Caldo enriquecido: Tryptic Soy Broth (TSB), Polianetol Sulfonato Sódico (SPS), Fatores de crescimento microbiano e Água Purificada.

Princípio

O Sistema Hemobac Trifásico é um produto destinado à realização de culturas de Sangue e seus componentes, Stem Cells (células tronco), Líquidos corpóreos e Nutrição Parenteral (inclusive em casos de suspeita de bacteremia). O sistema é composto por um Laminocultivo com 2 faces acoplado à parte superior de um recipiente plástico contendo Caldo enriquecido. Os meios de cultura que compõem o conjunto detectam o crescimento de microrganismos (Bactérias e Fungos) presentes na amostra, esse processo é dividido em 3 fases:

Fase 1: Caldo suplementado Trifásico, promove o crescimento de microrganismos, devido à riqueza de nutrientes. O SPS possui efeito anticoagulante impedindo a formação de coágulos durante a inoculação de amostras de sangue.

Fase 2: Meios de cultura sólidos que permitem o crescimento presuntivo de microrganismos específicos, em meios Agar Chocolate, Agar Sabouraud e Agar MacConkey.

Fase 3: Indicador de CO₂, detecta a presença de gás no interior do frasco (subproduto do metabolismo microbiano) ocasionando a alteração de coloração de amarelo para rosa intenso a vermelho.

A parte superior (Laminocultivo) é comercializada desconectada da parte inferior (caldo). A conexão pode ser realizada no momento da chegada do frasco ao laboratório independente do tempo decorrido da coleta. A conexão dos frascos deve ser realizada antes da incubação do sistema.

Possui duas apresentações, Adulta (45 mL) e Pediátrica (30 mL), visando manter a proporção amostra/caldo, de acordo com a quantidade possível de coleta.

Controle de Qualidade

Todos os lotes são submetidos a testes de Esterilidade e desempenho com cepas padrões ATCC, conforme descrito na tabela a seguir:

* Cepas	Crescimento	Sensibilidade
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Bom	1 UFC/mL
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Bom	
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	Bom	
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	Bom	

*500 mL de Inóculo 10² UFC/mL

Todos os documentos pertinentes a este produto como Certificado de Análise, FISPQ e Bula estão disponíveis no site www.probac.com.br.

Procedimento**1. Coleta**

- 1) Para inocular a amostra, no momento imediatamente antes da coleta, desinfetar o sítio de injeção do frasco com Álcool 70%, Álcool Iodado, Clorexidina alcoólica ou PVPI. Esperar pelo menos um minuto para o Álcool a 70%, Álcool Iodado e para a Clorexidina alcoólica e PVPI 2 minutos. O algodão, gaze ou sachê utilizado na assepsia da pele não deve ser o mesmo utilizado para a assepsia do frasco;
- 2) Inocular com seringa e agulha, preferencialmente nas quantidades de: 10,0 mL para pacientes adultos (acima de 13 Kg) ou volumes entre 5,0 mL e 10,0 mL. Nos frascos pediátricos: inocular preferencialmente nas quantidades de: 0,5 a 2,0 mL para recém-nascidos até 2,0 Kg e células-tronco (stem cells). Para crianças (entre 2,0 e 12,9 Kg) 5,0 mL. Os volumes sugeridos devem respeitar a condição clínica do paciente;
- 3) Para Nutrição Parenteral (NPP) seguir as orientações da farmacopéia ou legislação vigente para o volume e números de frascos mínimos a serem testados. Utilizar os frascos necessários para comportar os volumes requisitados mantendo a proporção de, no máximo, 10% em relação amostra e caldo;
- 4) Agitar o frasco até homogeneização por completo da amostra com o caldo.

2. Montagem do Sistema

- 1) O encaixe do laminocultivo deve ser realizado preferencialmente no laboratório, onde é possível trabalhar junto ao bico de Bunsen ou fluxo laminar, diminuindo o risco de contaminação;
- 2) Desrosquear a tampa do frasco sem tirá-la por completo;
- 3) Abrir o frasco do laminocultivo;
- 4) Retirar a tampa que já foi desrosqueada e encaixar o laminocultivo até o completo encaixe no frasco. Certifique-se que a tampa de rosca do laminocultivo esteja firmemente rosqueada.
- 5) Realizar a inversão do frasco para ocorrer a primeira sementeira nos meios sólidos: inverter o sistema gradualmente de maneira a fazer a sementeira das faces do laminocultivo e retornar a posição original lentamente, de forma que todo o meio líquido volte para a parte inferior do frasco;

3. Procedimento de Incubação**3.1. Semi-automatizado:**

- 1) Incubar a 35,0°C ± 2,0°C, por 6 a 8 horas;
- 2) Após esta pré-incubação realizar nova inversão do sistema;
- 3) Retornar a posição original lentamente, de forma que todo o meio líquido volte para a parte inferior do frasco (não manter o sangue em contato com os meios sólidos). Incubar a 35,0°C ± 2,0°C;
- 4) Observar, no mínimo, 2 vezes ao dia o aparecimento de colônias e/ou mudança do indicador; caso não haja alteração,

inverter o sistema novamente, banhando as faces do laminocultivo, retornar com o caldo para o frasco e reincubar a cada nova inversão até o penúltimo dia de incubação.

3.2 Automatizado:

- 1) Após 6 a 8 horas de incubação do frasco realizar uma inversão. Este frasco será novamente invertido automaticamente no horário programado pela Estufa para Hemobac Trifásico. Recomendamos programar a estufa para fazer a inversão a cada 8 horas para observar colônias na manhã do dia seguinte;
- 2) Fazer uma inversão diária após a leitura dos frascos e retirada das amostras positivas;
- 3) Sugerimos a observação dos frascos a cada 4 a 6 horas;
- 4) Nas rotinas sem o uso da Estufa para Hemobac Trifásico, tentar de acordo com o funcionamento do laboratório, realizar as inversões manualmente, conforme sugerido acima;
- 5) Não realizar mais que uma inversão ao dia não invalida a cultura, porém o aumento das inversões conforme mencionado facilita o crescimento bacteriano;
- 6) Para que o exame seja considerado automatizado é necessário o uso da Estufa para Hemobac Trifásico (estufa com temperatura controlada, agitação intermitente e inversão programada), que possui distribuição separada do produto;
- 7) A agitação favorece a rapidez e maior positividade.

4. Tempo de Incubação**4.1. Incubar por:**

SOMENTE PARA USO "IN VITRO" Rev.: 11



- 1) 5 dias para hemoculturas de rotina, cultura de líquidos nobres e NPP, nos casos de suspeita de bacteremia;
- 2) 4 a 6 semanas nos casos de bactérias de crescimento muito lento (p.ex. *Brucella spp*) manter incubado e inverter os frascos uma vez por semana;
- 3) para controle de hemocomponentes, células tronco (Stem Cells) utilizar procedimentos adotados por sua instituição;
- 4) 14 dias para teste de Esterilidade da NPP.

4.2. Pesquisa de Fungos:

- 1) Se houver pesquisa ou suspeita clínica de fungos filamentosos incubar por mais 8 a 10 dias totalizando 15 dias, no mínimo, à temperatura ambiente. O período pode ser estendido até 30 dias. Nestes casos recomendamos o uso de um frasco separado para a cultura de fungos, com inversão no momento do acoplamento, em 24, 48 e 72 horas e depois no 5º e 8º dias;
- 2) Nos controles microbiológicos após o período de incubação (5 ou 7 dias), estender a incubação até o 15º dia em temperatura ambiente, não necessitando de novas inversões nesse período.

5. Procedimentos Especiais

5.1. Hemoculturas Quantitativas:

No caso de hemoculturas quantitativas, quando é colhido sangue periférico e do cateter, recomendamos enviá-las de imediato ao laboratório para a montagem do sistema e a inversão dos dois frascos, após 2 horas de incubação. Estes

frascos não devem ser invertidos novamente no mesmo dia, se após 24 horas não houver crescimento bacteriano, inverter os frascos e seguir a rotina descrita acima para hemocultura e em caso de positividade, verificar a possibilidade de quantificação do crescimento. Esta conduta permite a contagem comparativa das colônias das duas amostras. Se no frasco inoculado com sangue obtido através do cateter, o número de colônias for superior a 5 vezes ao frasco do sangue periférico, indica uma infecção relacionada a este cateter. É importante semear uma quantidade igual de sangue em cada um dos frascos.

5.2 Controle de Esterilidade da NPP:

Utilizar os números de frascos dobrados para a mesma amostra: um para incubação a 35,0°C ± 2,0°C e outro entre 20º e 25°C. Para ambos a incubação deve ser, por pelo menos, 14 dias.

6. Leitura:

Ausência de crescimento ou de alteração da cor do indicador após o período de incubação proposto: reportar como negativo após o período de leitura descrito acima.

Presença de crescimento bacteriano nos meios sólidos: abrir o pote superior, desrosqueando a tampa com a lâmina, e proceder à identificação das colônias presentes, trabalhando de forma a assegurar a esterilidade do procedimento. Recomendamos que a coloração de Gram seja realizada, pois raras culturas destas amostras podem ser polimicrobianas.

A presença do meio **Agar MacConkey** facilita a identificação bacteriana, pois indica o isolamento de um bacilo Gram negativo na amostra. A ausência de crescimento no MacConkey, geralmente indica crescimento de bactérias Gram positivas, porém alguns bacilos Gram negativos não fermentadores da glicose e outras bactérias fastidiosas podem não crescer neste meio.

Observar **crescimento confluyente**: às vezes o crescimento em meio sólido pode passar despercebido porque as bactérias formam um "tapete" (película) sem colônias isoladas. Recomendamos na dúvida colher amostra da superfície com alça de platina e fazer coloração de Gram.

Mudança da cor do indicador durante o período de incubação: a presença da coloração rosa forte ou vermelho denota a multiplicação do microrganismo, indicando sua presença na amostra.

Desconsiderar as mudanças de cor acastanhadas ou levemente rosa, pois não indicam ação do CO₂. Se houver mudança na cor do indicador, sem a formação de colônias nos meios sólidos, aspirar com seringas o meio líquido através da tampa de borracha, fazer Gram do

aspirado, pois algumas bactérias metabolicamente deficientes podem crescer em meios líquidos e não em meios sólidos, neste caso deve-se então semear em meios suplementados (com vitaminas).

7. Observações:

- 1) A visualização do crescimento pode ser dificultada pela formação de água de condensação na parede do laminocultivo. Recomendamos a leve inclinação do frasco, de forma que o próprio meio líquido lave as paredes, sem entrar em contato com o laminocultivo.
- 2) Após a sementeira dos frascos, quando a hemocultura é positiva, o tempo de viragem da cor do indicador é variável. Esta velocidade depende do número de bactérias presentes no inóculo, da espécie bacteriana presente, e da viabilidade dos microrganismos. A maioria das espécies provoca viragem da cor entre 8 a 24 horas. Leveduras podem demorar 48 horas ou mais.
- 3) Bactérias não exigentes podem crescer também no Agar Sabouraud.
- 4) A *Candida spp* cresce no meio de Sabouraud e no Agar Chocolate.
- 5) Algumas espécies bacterianas, especialmente bactérias fastidiosas e não fermentadoras ou oxidativas podem produzir CO₂ em quantidades não detectáveis. Neste caso poderá ser observado o aparecimento de colônias sem a mudança de cor do indicador.
- 6) Embora as substâncias neutralizadoras de antimicrobianos sejam altamente efetivas, sempre é recomendado coletar as amostras de hemoculturas longe do pico do antimicrobiano administrado ao paciente (imediatamente antes da próxima dose da droga).

8. Cuidados

Não utilizar frascos nos quais o meio de cultura esteja turvo.

Não utilizar laminocultivos com colônias microbianas ou com o indicador de cor rosa forte ou vermelha.

Não utilizar o produto na presença de outros sinais de contaminação. Algumas substâncias do caldo podem apresentar precipitação de seus componentes. Tal alteração não compromete o desempenho nem a esterilidade do produto. Estas precipitações podem variar de cor branca a preta.

A coloração inicial do indicador pode variar de creme a ligeiramente acastanhado.

A coloração inicial do caldo pode variar de amarelo claro a âmbar.

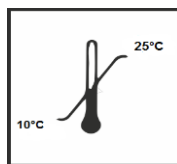
9. Limitações do Procedimento

O Caldo pode conter células mortas (inviáveis) derivadas de matérias-primas do próprio meio de cultura, por isso não é recomendável realizar teste de Gram partindo do inóculo do Caldo.

Recomendamos que o teste de Gram deverá ser realizado a partir de colônias que apresentarem crescimento no laminocultivo.

Não é recomendada a utilização do caldo sem o laminocultivo, o produto é eficaz e seguro quando utilizado em conjunto com o laminocultivo.

Conservação



Manter entre 10,0°C e 25,0°C.

Validade



6 meses a partir da data de fabricação.



Precauções

Após a realização dos testes, este material deverá ser descartado conforme as recomendações vigentes para resíduos de serviços de saúde.

Referências Bibliográficas

1. Koneman, E. W.; Allen, S. D. et al : Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th Edition. J. B. Lincott Company, Philadelphia, 2006.
2. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS, Bailey and Scott's - Diagnostic Microbiology.-11 Ed. Mosby, St Louis, 2002.
3. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover MC – Manual of Clinical Microbiologybiology.-9th Ed. ASM Press, Washington, DC, 2007.
4. Oplustil CP, Zoccoli CM, Tobouti NR, Sinto SI - Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica. Ed. Sarvier, São Paulo, 2004.
5. Runyon, Bruce A., *Management of adult patients with ascites due to cirrhosis*, Hepatology (39):1-16, 2004.
6. Cumitech- Blood Cultures IV. Editor Baron, EJ. Ed.ASM Press, Washington, DC, 2005.
7. Estudo Comparativo dos Sistemas BacT/Alert e Hemobac Trifásico para realização de hemoculturas. Edgar Garcez Junior, Álvaro Rodrigues Martins. Revista do Biomédico. Julho/Agosto, 2003. Ano 10. Nº 54.
8. Estudo Comparativo dos Sistemas BacT/Alert e Hemobac Trifásico para realização de hemoculturas. Edgar Garcez Junior, Álvaro Rodrigues Martins. Apresentação: 37º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial, Rio de Janeiro - RJ, Brasil, 2003.
9. Experiência com Hemobac Trifásico em hospital de Onco-hematologia. Levy CE; Mimica L; Mimica I; I. Centro Infantil Boldrini, Campinas - Apresentação: 37º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial, Rio de Janeiro - RJ, Brasil, 2003.
10. Avaliação do Sistema Hemobac Trifásico® no controle de qualidade microbiológico de bolsas de sangue e hemocomponentes. GAO Barna, LMJ Mimica, CR Kamura, RKF Guillaume, CB Silva, SP Bydlowski, DAF Chamone. Apresentação: Congresso de Hemoterapia/2004, São Paulo – SP, Brasil, 2004.
11. Barna GA, Mimica LM, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone DA, Evaluation of a culture system for the detection of microbial contamination of red cell and platelet concentrates. Scientific Section. *Transfusion* 45 (s3), 57A, 2005.
12. Barna GA, Mimica LM, Sierra PC, Silva CB, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone DA, Evaluation of two methods for detection of microbial contamination in platelet concentrates. Scientific Section. *Transfusion* 45 (s3), 57A, 2005.
13. Berezin EN, Iazzetti MA, Evaluation of the Incidence of Occult Bacteremia Among Children With Fever of Unknown Origin. *BJID* 2006; 10 (December)
14. Wu DC, Mimica LM, Silva CB, Ueda SM, Hida RY. Antimicrobial *In Vitro* Evaluation of Corneal Storage Media using a Closed Chamber Study Model *Curr Eye Res.* 2009 Jun;34(6):421-5
15. Avaliação dos concentrados plaquetários produzidos pelo Hemovida de Bauru. K Bortolotti, RA Bento, RBC Colim, CMS Assato. Apresentação: Congresso de Hemoterapia/2010. Brasília – DF, Brasil, 2010.
16. Fernandes AP, Silva CJ, Costa C, Schreiber AZ, Mello FA, Teixeira-Loyola ABA, Incidência Bacteriana em Hemoculturas no Hospital das Clínicas Samuel Libânio de Pouso Alegre MG. REAS, Revista Eletrônica Acervo Saúde, 2011. Vol. 2, 122-133.
17. Ramos AS, Botteon RCCM, Antunes MS, Veiga CCP, Oliveira A, Bacteremia transitória em cães com doença periodontal em diferentes procedimentos odontológicos e usuais. *Rev. Bras. Med. Vet.*, 33(2):79-84, abr/jun 2011
18. Araujo, ME de, Hemocultura: recomendações de coleta, processamento e interpretação dos resultados. *J Infect Control* 2012; 1 (1): 08-19.

