

Finalidade:

Sistema destinado à identificação bioquímica de bacilos Gram negativos, oxidase negativa e fermentadores da glicose.

Registro ANVISA:

10097010135

Apresentação:

510918 - ENTEROBACTERIAS-KIT-5X10TESTES

LB 170145
Rev. 12 – 08/2024

1. INTRODUÇÃO

A família *Enterobacterales* é a maior e mais heterogênea ordem de importância médica. São considerados aproximadamente 27 gêneros, 102 espécies e 08 grupos indefinidos.

São bacilos Gram-negativos (BGN), não esporulados, com motilidade variável, oxidase negativos, e que crescem em meios básicos, meios ricos e meios seletivos. São anaeróbios facultativos (crescem em aerobiose e anaerobiose), fermentam a glicose com ou sem produção de gás, são catalase positivos e reduzem nitrato a nitrito.

A maioria desses microrganismos é encontrado no trato gastrointestinal de humanos, no reino animal, na água, solo e vegetais. Alguns também são considerados enteropatógenos por causarem preferencialmente infecções gastrointestinais como a *Salmonella typhi*, outras espécies de *Salmonella*, *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica* e alguns sorotipos de *Escherichia coli*, embora possam também causar infecção em outros locais. As enterobactérias representam 80% ou mais de todos os Gram negativos de importância clínica isolados na rotina microbiológica. São responsáveis por de cerca de 70% das infecções urinárias e 50% das septicemias.

As *Enterobacterales* que atualmente predominam em infecções hospitalares são *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. (90%) seguidos de *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Morganella* spp., *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Serratia* spp. As enterobactérias menos isoladas são *Edwardsiella* spp., *Hafnia* spp., *Yersinia* spp. Baseado em dados de prevalência e importância clínica, considera-se necessário que os laboratórios de microbiologia utilizem metodologia que permita discriminar com ≥80% de acerto.

O sistema proposto pela Laborclin utiliza 5 meios de cultura que fornecem 10 provas bioquímicas, que associadas à leitura da fermentação da lactose (proveniente do meio de isolamento) permitem uma identificação segura da bactéria analisada.

2. COMPOSIÇÃO

2.1- Tubo 1 (RUGAI SEM SACAROSE)

Formulação	Concentração/L
Citrato de ferro amoniacal	2g
Tiosulfato de sódio	2g
Dextrose	10g
Uréia	40g
Nutrientes	23g
Agar	11,0g
Cloreto de sódio	5g
Fosfato dissódico	2 g
L – triptofano	1 g
Azul de bromotimol	0,03g
Água deionizada	1000mL
pH 7,4± 0,2 a 25°C	

2.2- Tubo 2 (LMI)

Formulação	g/L
Digesto Pancreático de Caseína	10,0

Extrato de levedura	3,0g
Peptona	10,0g
Triptona	10,0g
L- Lisina	10,0g
Dextrose	1,0g
Ágar	2,0g
Água deionizada	1000mL
pH 6,6 ± 0,2 a 25°C	

2.3- Tubo 3 (MIO)

Formulação	g/L
Extrato de levedura	3,0g
Peptona	10,0g
Triptona	10,0g
L- Ornina	5,0g
Dextrose	1,0g
Ágar	2,0g
Água deionizada	1000mL
pH 6,5 ± 0,2 a 25°C	

2.3- Tubo 4 (Meio de Ramnose)

Formulação	Concentração/L
Digesto Enzimático de Tecido Animal	10g
Extrato de carne	1g
Cloreto de Sódio	5g
Purpura de Bromocresol	0,02g
L-Ramnose	50g
Água deionizada	1000mL
pH 6,8± 0,2 a 25°C	

2.4- Tubo 5 (Meio de Citrato)

Formulação	Concentração/L
Sulfato de Magnésio	0,2g
Fosfato di-hidrogênio de amônio	1,0g
Citrato de Sódio	2,0g
Azul de Bromotimol	0,08g
Cloreto de Sódio	5,0g
Água	1000mL
pH 6,9 ± 0,2 a 25°C	

Vaselina Estéril

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

3. AMOSTRA

a- Tipos de amostras

- Colônias recém-obtidas de bacilos Gram negativos provenientes de meios de isolamento diferencial que permitam a leitura da lactose, como o Ágar Mac Conkey, Ágar Eosina Azul de Metileno, CLED etc.

- As colônias a serem identificadas devem ser recentes (no máximo de 24h) e bem isoladas. Caso a identificação tenha de ser protelada, deve-se proceder ao repique do material em meio

apropriado e a uma nova incubação a 35±2°C por 18 a 24 horas, para então realizar a identificação.

- 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.
- Rejeitar as colônias provenientes de culturas com mais de 24 horas de semeadura.

4. INFORMAÇÕES GERAIS SOBRE O PRODUTO

a- Princípio

As colônias que se deseja identificar são semeadas em 5 tubos de meios de cultura que compõem o conjunto, que serão incubados a seguir a 35°C por 18-24h. Terminada a incubação, é realizada a leitura dos tubos, e os dados são analisados através de tabela apropriada ou por via eletrônica, para então se obter a identificação da bactéria analisada.

b- Armazenamento e estabilidade

Para fins de transporte, o produto pode permanecer em temperatura ambiente por até 72h. No laboratório os tubos devem ser armazenados 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.

c- Precauções e cuidados especiais

- O produto é 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 tubos 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;
- Agulha bacteriológica;
- Bico de Bunsen;
- Reativo de Kovac's.
- Manual para identificação impresso.

6. PROCEDIMENTO TÉCNICO

- Deixar que os meios de cultura e demais materiais atinjam temperatura ambiente;
- Usando a agulha bacteriológica flambada, encostar na superfície de uma colônia e inocular no tubo nº1 por picada central até o fundo do tubo e ao voltar a agulha, semear por estrias a superfície inclinada do meio; fechar o tubo deixando a tampa frouxa para uma melhor aeração;
- Usando a mesma agulha do tubo anterior (sem flambar) inocular o tubo nº2 por picada central até o fundo e a seguir fechar o tubo;
- Usando a mesma agulha (sem flambar) do tubo anterior, inocular o tubo nº3 por picada central até o fundo, cuidando para que ao

voltar, a agulha siga o mesmo trajeto (para não criar dificuldades na prova da motilidade) fechando o tubo a seguir;

- Flambar a agulha e encostar na mesma colônia, semeando o tubo no 4 na superfície, cobrindo-o com vaselina estéril (para garantir ambiente anaeróbico) e fechando o tubo em seguida;
- Flambar a agulha, encostar novamente na mesma colônia e semear a superfície do tubo nº5, cuidando para que não haja excesso de inóculo e fechando o tubo a seguir;
- Incubar a bateria de tubos em estufa bacteriológica entre 35 e 37°C/18 a 24h e ler os resultados:

7. RESULTADOS

Tubo nº1

Desaminação do L-Triptofano (TRI):

- Positivo: Desenvolvimento de uma cor verde garrafa no ápice do tubo;
- Negativo: Mantém-se a cor original do meio (verde azulado) no ápice do tubo.

Fermentação da glicose (GLI):

- Positivo: Desenvolvimento de uma cor amarela no fundo do tubo (esta cor pode estar mascarada no caso de bactérias que produzem H₂S ou que hidrolisam a ureia, formam-se respectivamente coloração negra e azulada);
- Negativo: O fundo do tubo mantém a cor original do meio (verde azulado): não se trata de enterobactéria.

Produção de gás a partir da glicose (GAS):

- Positivo: Desenvolvimento de bolhas com intensidade variável no interior do meio;
- Negativo: O meio mantém-se íntegro.

Produção de gás sulfídrico (H₂S):

- Positivo: Desenvolvimento de cor negra de intensidade variável no fundo do tubo;
- Negativo: O meio mantém coloração diferente da mencionada.

Hidrólise da ureia: apesar desta prova não fazer parte do sistema, ela pode ser utilizada como subsídio para a identificação (prova complementar);

- Positivo: Desenvolvimento de coloração azul na base do tubo (que pode mascarar a leitura da prova da glicose, ou pode estar mascarada quando a bactéria produz concomitantemente H₂S);
- Negativo: Coloração diferente da mencionada.

Tubo nº2

Descarboxilação da lisina (LIS):

- Positivo: Desenvolvimento de coloração que passa do amarelo à púrpura no meio;
- Negativo: Desenvolvimento de coloração amarela no meio.

Tubo nº3

Descarboxilação da ornitina (ORN):

- Positivo: Desenvolvimento de coloração que passa do amarelo à púrpura no meio;
- Negativo: Desenvolvimento de coloração amarela no meio.

Observação: Tanto no meio para lisina como no meio para a ornitina, a coloração inicialmente amarela nas primeiras horas de incubação é devida a fermentação da glicose presente no meio, indicativo da viabilidade da bactéria inoculada. Em ambos os meios (LMI e MIO) podem ser feitas as leituras de indol e motilidade.

Motilidade (MOT):

- Positiva: Crescimento difuso com turvação total ou parcial do meio;
- Negativa: Crescimento restrito à linha de picada.

Indol (IND):

Adicionar 2-4 gotas do reativo de Kovac's sobre a superfície do meio e aguardar cerca de dois minutos:

- Positivo: Surgimento de um anel vermelho;
- Negativo: Não se desenvolve coloração no reagente.

- Tubo nº4

Rhamnose (RHA):

- Positivo: Desenvolvimento de uma coloração amarela com turvação do meio;
- Negativo: O meio mantém sua coloração original e com crescimento (turvação).

- Tubo nº5

Citrato (CIT):

- Positivo: Observa-se crescimento no meio e/ou desenvolvimento de coloração azul;

- Negativo: A coloração do meio se mantém inalterada e sem sinais de crescimento.

Observação: Alguns isolados do gênero *Providencia* spp podem apresentar reação falso negativa na prova de indol no tubo MIO (motilidade, indol e ornitina), devido a acidificação do meio promovido por este microrganismo. Para estes casos realizar a confirmação desta prova no tubo LMI (lisina, motilidade e indol) ou diretamente da colônia. Este procedimento também pode ser realizado, para outros isolados bacterianos, em caso de dúvida interpretativa da prova negativa.

8. LIMITAÇÕES DO MÉTODO

(Riscos Residuais Identificados conforme RDC 36/2015)

Os riscos residuais existentes acerca dos resultados da interpretação do kit:

- Uso de colônias isoladas em um período superior a 24 horas. A partir deste período, o metabolismo bacteriano pode ficar comprometido e a leitura de alguns parâmetros podem consequentemente ficar defasados ou até mesmo não ocorrer.
- Colônias recentes (inferior ao período de 18 horas) não se encontram com o metabolismo bem definido. Algumas provas podem não ocorrer.
- Deve-se evitar uma sobrecarga de inóculo no tubo de nº 1.
- É imprescindível ao incubar os tubos de nº 1 deixar as tampas frouxas e para a leitura do Indol, utilizar somente o Reativo fornecido juntamente com os tubos.
- A leitura das provas deve ser realizada dentro de um período de 18 a 24 horas. Não exceder e não antecipar o período de leitura para não comprometer os resultados.

9. CONTROLE DA QUALIDADE

- *Materiais necessários*

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

- *Controle de qualidade recomendado:*

Cepas	Resultado esperado	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	MEIO MIO (Tubo 3)	ORN + MOT + IND +
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	MEIO RUGAI SEM SACAROS E (Tubo 1)	LTD + GAS – H2S + URE +
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	MEIO LISINA (Tubo 2)	LIS – MOT + IND –
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	MEIO ORNITINA (Tubo 3)	ORN + MOT + IND –
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	MEIO RAMNOSE (TUBO 4)	RAM –
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	MEIO CITRATO (TUBO 5)	CIT +
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	MEIO RUGAI SEM SACAROS E (Tubo 1)	LTD – GAS + H2S – URE +
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	MEIO LISINA	LIS+ MOT –

	(Tubo 2)	IND –
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	MEIO ORNITINA (Tubo 3)	ORN – MOT – IND –
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	MEIO RAMNOSE (TUBO 4)	RAM +
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	MEIO CITRATO (TUBO 5)	CIT +

- *Periodicidade*

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

- *Análise dos resultados*

Os tubos do KIT DE ENTEROBACTÉRIAS testados com cepas padrão devem expressar os resultados esperados. Caso se constate algum problema, os resultados de amostras clínicas 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










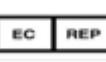
















1. Edwards, P.R. & Ewing, W.H. Identification of Enterobacteriaceae, 3rd edition, Burgess Pub. Co., CINN, 1972.
2. Fontes, C.F. Proposição de dois novos meios de cultura e de um sistema simplificado para identificação de enterobactérias, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1979.
3. Lenette, Edwin H. Microbiologia clínica, B. Aires: Editorial Medica panamericana, 3 ed., 1982.
4. Finegold, S.M.; Baron, E.J. Diagnóstico microbiológico. B. Aires: Ed. Medica Panamericana, 7 ed, 1989.
5. Mahon, C.E.; Manuselis Jr., G. Diagnostic microbiology, Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1995.
6. Koneman, Elmer W. et al. Diagnostic microbiology, 5th ed., 1997.
7. Ewing, W.H. Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae, 4th ed. Elsevier Science Pub. Co., Inc, N.Y., 1986.



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)

