

Finalidade:

Meio de cultura sólido destinado à triagem de enterobactérias.

Registro ANVISA:

100.970.10-135

Apresentação:

510105 - RUGAI S/SACAROSE-EPM-5mL-TB13X100-CX10TB

LB 172211

Rev. 03 -08/2024

1. INTRODUÇÃO

O meio de Rugai sem Sacarose, também conhecido como meio da Escola Paulista de Medicina (EPM) permite a execução simultânea de seis provas bioquímicas de identificação de enterobactérias: Desaminação do L-triptofano, Glicose, produção de Gás, produção de H₂S e Hidrólise da uréia.

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

São bacilos Gram-negativos, 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 das enterobactérias é encontrada 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 enterobactérias 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.

2. COMPOSIÇÃO

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	

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

3. AMOSTRA**a- Tipos de amostras**

- Colônias recém-obtidas de bacilos Gram-negativos, fermentadores da glicose, provenientes de meios de isolamento adequados.

- As colônias a serem identificadas devem ser recentes (no máximo de 24h). Caso a identificação tenha de ser protelada, deve-se proceder ao repique do material em meio apropriado e a uma nova incubação a 35°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.

b- Precauções e cuidados especiais

- Produto destinado para 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, invariavelmente, 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**

As colônias a identificar são semeadas por picada em profundidade e estriamento de superfície em um tubo contendo o meio inclinado, seguido de incubação a 35°C por 18-24h. Após a incubação, é realizada a leitura das provas, e os dados são pesquisados em tabelas apropriadas.

b- Reagentes

Tubos de vidro contendo duas porções de meio de cultura sendo divididos por uma fase intermediária.

A porção superior é composta por uma mistura de vários substratos, sais e indicadores. A porção intermediária é constituída de uma cera que possui a finalidade de evitar a positividade da porção inferior que por sua vez é constituída por um meio semi-sólido, substratos e solução indicadora.

c- 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 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.

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 ($\pm 35^{\circ}\text{C}$) 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.

d- 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.

6. PROCEDIMENTO TÉCNICO

- a- Retirar da embalagem a quantidade de tubos a serem usados e colocar os mesmos em estufa bacteriológica a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ até adquirirem esta temperatura;
- b- Retirar os tubos da estufa e identificar cada um seguindo os critérios adotados pelo laboratório;
- c- Usando a agulha bacteriológica estéril, encostar na superfície de uma colônia.
- d- Inocular através de uma picada central, passando pela fase intermediária, atingindo o meio LMI, sem tocar o fundo do tubo de vidro.
- e- Retornar a agulha em direção à superfície, percorrendo o mesmo caminho e ao atingir a superfície fazer o estriamento em todo o ápice do meio;
- f- Incubar em estufa bacteriológica a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas com a tampa frouxa.
- g- Realizar leitura das provas nos meios.

LEITURA REALIZADA NA BASE

- Fermentação da Glicose

OBS: esta prova deve ser obrigatoriamente positiva para todas as enterobactérias, devendo-se atentar para o fato de que, nos casos de bactérias que produzem H_2S ou hidrolisam a uréia, o amarelo é mascarado.

Reação positiva: meio amarelo

Reação negativa: meio inalterado

- Produção de Gás:

Reação positiva: Formação de bolhas ou rachaduras

Reação negativa: meio inalterado

- Produção de Sulfeto de Hidrogênio (H_2S)

Reação positiva: presença de pigmento negro

Reação negativa: ausência de pigmento negro

- Hidrólise da Uréia

Reação positiva: coloração azul esverdeada

Reação negativa: meio inalterado

- Prova do Indol

- Realizar a leitura imediata, após pingar 1 a 2 gotas do Reativo de Kovacs.

Reação positiva: viragem da cor do reativo para rosa

Reação negativa: reativo com coloração inalterada (amarela)

LEITURA REALIZADA NO ÁPICE

- Desaminação do L-Triptofano:

Reação positiva: meio verde escuro ou acastanhado

Após realizar leitura dos resultados das provas, consultar tabelas para identificação presuntiva.

7. RESULTADOS

A qualidade dos resultados de análises microbiológicas está intimamente ligada à qualidade da amostra, as melhores práticas pré-analíticas, como cuidados extremos com a assepsia do processo ou paciente, assim como a utilização de meios de cultura indicados e de boa qualidade garantem um melhor resultado.

Relatório

a- Desaminação do L-Triptofano (TRI): prova positiva quando há desenvolvimento de coloração verde garrafa no ápice do tubo e a prova negativa se caracteriza pela manutenção da cor original do meio ou cor amarelada;

b- Fermentação da glicose (GLI): o surgimento de cor amarela na porção inferior de meio, caracteriza prova positiva, do contrário, o meio mantém-se inalterado; esta prova deve ser obrigatoriamente positiva para todas as enterobactérias, devendo-se atentar para o fato de que, nos casos de bactérias que produzem H_2S ou hidrolisam a uréia, a cor amarela é mascarada;

c- Produção de gás a partir da glicose (GAS): caso a bactéria em estudo produza gás a partir da glicose, irão se formar bolhas no interior do meio, podendo em alguns casos o meio pode chegar a se partir e sofrer deslocamento;

d- Produção de gás sulfídrico (H_2S): a produção de gás sulfídrico é evidenciada pelo surgimento de coloração negra com intensidade variável na porção inferior de meio;

e- Hidrólise da uréia: considera-se a prova positiva quando há a formação de uma coloração azulada na porção inferior de meio.

8. LIMITAÇÕES DO MÉTODO

(Riscos Residuais Identificados conforme RDC 830/2023)

Os riscos residuais existentes acerca dos resultados do Rugai com Lisina:

- 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 Rugai.
- É imprescindível ao incubar os tubos de Rugai 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	IND LTD GAS H ₂ S GLI URE	POSITIVO NEGATIVO POSITIVO NEGATIVO POSITIVO NEGATIVO
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	IND LTD GAS H ₂ S GLI URE	NEGATIVO NEGATIVO POSITIVO NEGATIVO POSITIVO NEGATIVO
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	IND LTD GAS H ₂ S GLI URE	NEGATIVO NEGATIVO POSITIVO NEGATIVO POSITIVO POSITIVO
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	IND LTD GAS H ₂ S GLI URE	NEGATIVO POSITIVO NEGATIVO POSITIVO POSITIVO POSITIVO
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	IND LTD GAS H ₂ S GLI URE	NEGATIVO NEGATIVO POSITIVO POSITIVO POSITIVO NEGATIVO

- 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.

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. Finegold, S.M.; Baron, E.J. Diagnóstico microbiológico. B. Aires: Ed. Medica Panamericana, 7a ed, 1989.
2. Koneman, Elmer W. Diagnóstico microbiológico. B. Aires: Ed. Medica panamericana, 6ed., 2010.
3. Lenette, Edwin H. Microbiologia clínica, B. Aires: Editorial Medica panamericana, 3a ed., 1982.
4. Mahon, C.E.; Manuselis Jr., G. Diagnostic microbiology, Philadelphia: W.B. Saunders Co. 1995.

11. PRODUTOS RELACIONADOS

571004 KOVACS-REATIVO FR 10 mL.



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)