

KIT EPM - MILI – CITRATO

Conjunto de meios de cultura para triagem bioquímica de enterobactérias

NOME TÉCNICO

CONJUNTO DE MEIOS DE CULTURA PARA TRIAGEM BIOQUÍMICA DE ENTEROBACTÉRIAS

APRESENTAÇÃO

Caixa com 16 testes – Cód. PA116

COMPOSIÇÃO

Formulação	g/L
EPM	
Ágar bacteriológico	11,0
Triptona	10,0
Extrato de carne	2,0
Cloreto de sódio	5,0
Fosfato dissódico	2,0
L-triptofano	1,0
Substrato de Rugai	17,5 mL/L
Sol. alcoólica a 1,5% de azul de bromotimol	2,0 mL/L
Água purificada	1000 mL
MILI	
Extrato de levedura	3
L-lisina	5
Glicose	0,5
Ágar bacteriológico	4
Nitrato de potássio	0,5
Púrpura de bromocresol	0,02
Água purificada q.s.p.	1000 mL
CITRATO	
Sulfato de magnésio	0,02
Fosfato de amônio dihidrogenado	1
Citrato de sódio	2
Cloreto de sódio	5
Azul de bromotimol	0,08
Agar bacteriológico	15
Água purificada	1000 mL
REATIVO DE KOVACS	
Para-dimetilaminobenzaldeído	50
Ácido Clorídrico	250 mL/L
Álcool butílico normal	750 mL/L

REGISTRO NO MINISTÉRIO DA SAÚDE:

10287910073

ARMAZENAMENTO

Conservar o produto em temperatura ambiente (10 a 30° C).
Válido por 300 dias após a fabricação.
Verificar o prazo de validade na embalagem.
Nunca utilizar produtos com validade expirada.

TRANSPORTE

Transportar o produto em temperatura ambiente (10 a 30° C).

Atenção: O meio MILI é um meio semissólido e precisa ser transportado com cuidado e mínima agitação, para não perder sua estabilidade.

CUIDADOS ANTES DO USO

Por tratar-se de material estéril, manusear o produto utilizando equipamentos de proteção individual (luvas, avental e máscara) em ambiente com assepsia de preferência em cabine de segurança biológica classe II.
Não usar materiais com selo de qualidade rompido ou violado.

MATERIAIS E EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS COM O PRODUTO

Alça e agulha bacteriológica.

INFORMAÇÕES TÉCNICAS

- FINALIDADE

A finalidade deste sistema é a triagem bioquímica de enterobactérias, possibilitando a identificação do gênero das cepas isoladas de coproculturas e uroculturas de pacientes ambulatoriais. O sistema EPM – MILI – Citrato possui uma boa vantagem sobre o meio de Rugai com lisina (Pessoa e Silva) pois as duas fases encontram-se em tubos separados, evitando assim interferências nas provas.

- AMOSTRA

Colônias de bacilos gram-negativos oxidase-negativa isoladas de amostras clínicas de urina ou fezes, em placas de meios de cultivo primários seletivos para bactérias gram-negativas.

- TÉCNICA DE USO RECOMENDAÇÕES

Antes da inoculação, deve-se observar a capacidade da bactéria fermentar a lactose no ágar Mac Conkey e realizar a prova da oxidase. As enterobactérias são sempre oxidase negativa e a maioria dos BGN que fermentam a lactose pertencem à família das enterobactérias. As colônias oxidase positiva/lactose negativa são provavelmente de bacilos gram-negativos não-fermentadores da glicose e devem ser identificadas por outros sistemas (p.ex.: NF-PROV).

INOCULAÇÃO

Inocular os tubos do kit utilizando uma colônia bem isolada, conforme descrito a seguir:

1º - Com uma agulha bacteriológica, tocar uma porção da colônia isolada e inocular o tubo de EPM com uma picada central até o fundo do tubo e depois estriar a parte inclinada do mesmo;

2º - Com o mesmo inóculo estriar a porção inclinada do tubo de Citrato;

3º - Tocar novamente a mesma colônia selecionada e realizar uma picada central no tubo de MILI, sem encostar no fundo do tubo mas chegando bem próximo deste.

INCUBAÇÃO

Os três tubos devem ser incubados a 35 ± 2° C, por 18 a 24 horas. O tubo de EPM e o tubo de Citrato devem ser incubados com a tampa frouxa para permitir a entrada de oxigênio e o tubo de MILI com a tampa apertada, para favorecer a atmosfera anaeróbia, facilitando a ativação da enzima descarboxilase.

LEITURA E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

LEITURA DO EPM:

a) Glicose: para o micro-organismo pertencer ao grupo das enterobactérias a base do tubo deve tornar-se amarela (fermentação da glicose). Se após 24 horas de incubação a base do tubo permanecer verde a bactéria é não fermentadora da glicose e não poderá ser triada por este sistema (para a identificação deve-se usar o kit para não fermentadores - NF-PROV).

b) H₂S: se a bactéria em questão produzir a enzima dessulfidrase haverá enegrecimento da base do tubo. Entretanto certas espécies podem produzir pouco H₂S, deixando apenas um anel negro na porção intermediária do tubo (p.ex.: *S. typhi*). Quando a bactéria produz muito H₂S e enegrece toda a base do EPM a leitura da glicose fica prejudicada. Nestes casos deve-se considerar a glicose positiva.

c) Gás: as bactérias que têm a capacidade de fermentar a glicose com produção de gás promovem o aparecimento de bolhas que arrebentam o fundo do meio de EPM. Quando a bactéria produz pouco gás pode ocorrer apenas um pequeno deslocamento do meio a partir da base do tubo, o que deve ser considerado como prova positiva.

d) LTD: deve ser lido no ápice do tubo. As bactérias produtoras de l triptofanodesaminase promovem o escurecimento do meio. A cor produzida é o verde musgo (escuro), bem diferente da cor verde original. A cor verde clara, azul ou azul esverdeada indica prova negativa.

e) Uréia: as bactérias que produzem a enzima urease desdobram a uréia, alcalinizando a base do tubo e provocando a viragem do indicador para azul.

LEITURA DO MILI:

f) Motilidade: micro-organismos móveis crescerão em todas as direções a partir da picada central, enquanto bactérias imóveis só apresentarão indicio de crescimento no local da picada (parte central do tubo).

g) Indol: após decorridas 18 a 24 horas de incubação, acrescentar de 3 a 5 gotas do reativo de Kovacs à superfície do meio de MILI. O aparecimento de uma coloração vermelho-rósea indica que a bactéria produz triptofanase (indol positivo). Se o reativo permanecer amarelo a prova é negativa.

h) Lisina: as enterobactérias capazes de descarboxilar a lisina primeiro fermentam a glicose presente no meio, tornando-o amarelo (ácido). Uma vez acidificado o meio ocorre a ativação da enzima lisina-descarboxilase que provoca uma alcalinização do meio com nova mudança de cor, tendendo para o roxo. A leitura é feita da seguinte maneira: amarelo claro e brilhante - lisina negativa; qualquer cor diferente do amarelo - lisina positiva.

LEITURA DO CITRATO:

i) Citrato: as bactérias capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono conseguem crescer neste meio. Meio de cor original verde, tornando-se azul em caso de prova positiva e permanecendo verde para provas negativas.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS:

Anotar o resultado de todas as provas e da fermentação da lactose (verificada no meio de Mac Conkey ou outro meio seletivo e diferencial para bacilos gram negativos) e então utilizar a **ferramenta Identax**, disponível para download:

- 1 - Entrar em "login" no site da Newprov (www.newprov.com.br);
- 2 - Colocar o e-mail e a senha ou, caso não tenha cadastro, cadastrar-se seguindo as orientações do site;
- 3 - Clicar em "identificação de enterobactérias" e baixar a ferramenta seguindo as orientações do site;
- 4 - Clicar no ícone, após realizado os procedimentos acima, clicar em "new workspace", selecionar matrix identax e clicar em "create workspace".
- 5 - Clicar em +, - ou ? nas linhas referentes às provas realizadas;
- 6 - O Identax irá, automaticamente, calcular quais são as possíveis bactérias e o percentual de probabilidade para cada;

7- Quando a identificação ficar definida, aparecerá no lado direito a bactéria finalizada e o percentual estimado.

DESCARTE DO PRODUTO E DA AMOSTRA

Descartar o produto e a amostra de acordo com o programa de gerenciamento de resíduos do laboratório.

* Para o produto sem contato com a amostra seguir o plano de gerenciamento de resíduos químicos.

* Para a amostra e produto com amostra seguir plano de gerenciamento de resíduos infectantes ou possivelmente infectantes.

* Após incubação o produto deverá ser autoclavado a 121° C por 30 minutos e descartado em lixo apropriado.

CONTROLE DE QUALIDADE

Normas internacionais adotadas pela maioria dos países recomendam que somente meios de cultura adquiridos prontos para uso contendo substratos instáveis devem ser retestados pelo usuário. O kit EPM-MILI-Citrato tem estabilidade garantida dentro do prazo de validade informado.

GARANTIA DA QUALIDADE

Este produto é fabricado e liberado para venda após testes de controle de qualidade para cada lote, conforme normas das Boas Práticas de Fabricação e Controle de produtos para diagnóstico de uso *in vitro*.

Para eficácia do produto é necessário:

- Utilizar amostras clínicas coletadas, transportadas e armazenadas de acordo com a indicação da literatura especializada;
- Seguir rigorosamente todas as etapas descritas nesta instrução de uso.
- Utilizar acessórios e equipamentos adequados e em boa conservação.
- Transportar e armazenar o produto de acordo com as condições indicadas.
- Nunca utilizar produtos com a embalagem original danificada.
- Nunca utilizar produto com prazo de validade expirado.

Caso ocorra qualquer problema na utilização do produto relativo à qualidade intrínseca do mesmo, que tenha ocorrido por falha de fabricação comprovada, a Newprov resolverá a questão sem ônus ao cliente, conforme determinado na Lei 8.078/90 – Código de Defesa do Consumidor.

A Newprov disponibiliza aos seus clientes assessoria técnico-científica para quaisquer esclarecimentos necessários quanto a utilização deste produto que não estejam contemplados nesta instrução de uso, através de contato com o SAC - Serviço de Atendimento ao Consumidor.

Certificados de análise de cada lote estão disponíveis na empresa e podem ser encaminhados ao cliente sempre que solicitados ao SAC ou acesso pelo site www.newprov.com.br após cadastro no campo de acesso restrito.

A versão atual da instrução de uso encontra-se disponível no site www.newprov.com.br. Na necessidade da versão impressa, solicitar sem custo adicional (inclusive de envio) ao nosso SAC pelo (41) 38881300 ou sac@newprov.com.br.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DIFCO & BBL MANUAL. **Manual of Microbiological Culture Media**. Maryland: Becton, Dickinson and Company, 2003.

ISENBERG, H. D. (Ed.) **Clinical Microbiology Procedures Handbook**. 2nd Ed. Washington DC: ASM, 2004.

MANUAL OXOID. São Paulo: Oxoid Brasil Ltda., 2000.

MURRAY, P. R. et al. (Eds) **Manual of Clinical Microbiology**. 9th Ed. Washington D.C.: ASM, 2007.

NCCLS. **Quality Assurance for Commercially Prepared Microbiological Culture Media**. 2nd Ed. NCCLS Document M22-A2. Wayne, PA: NCCLS, 1996.

WINN Jr., W. et al (Eds.) **Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. 6th Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO DE USO *IN VITRO*

Fabricado e distribuído por:

Newprov Produtos para Laboratório Ltda

Rua 1º de Maio, 590/608 - Centro - CEP: 83323-020 - Pinhais - PR

CNPJ: 73.636.391/0001-09

Responsável Técnica:

Bárbara Pereira Albini – CRF/PR 19057

Indústria Brasileira

Serviço de Assessoria e Soluções de excelência em análises laboratoriais

SAC: 41 38881300 – sac@newprov.com.br