

PAINEL PARA IDENTIFICAÇÃO DE BACILOS GRAM NEGATIVOS NÃO FERMENTADORES DE GLICOSE PROBAC

KIT NF III

Indicação:

O KIT NF III destina-se à identificação dos bacilos Gram negativos não fermentadores da glicose isolados no laboratório clínico. O Kit é constituído por provas realizadas em microplacas, tubos, discos e fitas e um aplicativo com um Banco de Dados que permite identificar os resultados das leituras em forma informatizada. A identificação ocorre através das alterações de pH, hidrólise dos substratos e produção de produtos metabólicos.

Características dos componentes:

A) Provas realizadas com meios desidratados em microplacas: O painel é constituído por 19 provas: decarboxilação de lisina, arginina e controle; crescimento em NaCl 6,5% e Agar MacConkey; liquefação da gelatina, hidrólise da esculina e uréia; utilização da glicose, maltose, lactose, manitol, citrato e ONPG; produção de indol e DNase; sensibilidade à Polimixina; redução de nitratos e deaminação da fenilalanina.

Apresentação:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	CON	LIS	ARG	NaCl	GEL	ESC	GLIC	MAL	LAC	MAN	POL	URE
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	DNA	NIT	ONP	FEN	IND	MAC	CIT					

Abreviações/Provas:

Painel	Prova	Abreviação
A1	Controle dos aminoácidos	CON
A2	L- lisina	LIS
A3	L- arginina	ARG
A4	Crescimento em NaCl 6,5%	NaCl
A5	Teste da gelatina	GEL
A6	Hidrólise da esculina	ESC
A7	Utilização de glicose	GLI
A8	Utilização de maltose	MAL
A9	Utilização de lactose	LAC
A10	Utilização de manitol	MAN
A11	Sensibilidade à polimixina	POL
A12	Hidrólise da uréia	URE

Painel	Prova	Abreviação
B1	Teste de DNase	DNA
B2	Redução de Nitrato	NIT
B3	Utilização de β-D-galactosidase	ONP
B4	Triptofano desaminase	FEN
B5	Produção de Indol	IND
B6	Crescimento em Agar MacConkey	MAC
B7	Citrato de Simmons	CIT

B) Provas realizadas em tubos: provas para realização do teste de motilidade e crescimento a 42°C.

C) Prova realizada em disco: teste de PYR

D) Prova realizada em fita: teste da Oxidase.

E) Aplicativo com banco de dados para diagnóstico informatizado com cálculo de probabilidade do isolado: Todas as 23 provas devem ser feitas para a identificação de um isolado de bacilo Gram negativo não fermentador, porém a leitura de determinadas provas e sua inserção no aplicativo dependerá dos resultados de algumas provas fundamentais. Estas provas são motilidade, oxidase e produção de indol que associadas à morfologia do isolado na coloração de Gram, classificarão o micro-organismo em uma das opções abaixo citadas permitindo introduzir somente os resultados necessários solicitados pelo aplicativo:

- Oxidase negativa e motilidade negativa
- Oxidase negativa e motilidade positiva
- Oxidase positiva e motilidade negativa: cocos

SOMENTE PARA USO DIAGNÓSTICO "IN VITRO" Rev.: 04

PROBAC DO BRASIL Produtos Bacteriológicos Ltda.
 Rua Jaguaribe, 35 – Sta. Cecília - São Paulo – SP - CEP: 01224-001
 Fone: 55 11 3367-4777 - Fax: 55 11 3223-8368
 CNPJ 45.597.176/0001-00 -Insc. Est. 110.485.842.111
 Site: www.probac.com.br E-mail: probac@probac.com.br

- Oxidase positiva e motilidade negativa: bacilos, indol positivo
- Oxidase positiva e motilidade negativa: bacilos, indol negativo
- Oxidase positiva e motilidade positiva

Procedimento

Os testes devem ser realizados a partir de colônias isoladas e puras e sabidamente não fermentadoras de glicose.

A) Painel:

- Abrir o envelope e retirar o painel.
- Guardar o envelope para incubação do painel.
- Turvar 3 a 4 mL da solução inoculante Probac do Brasil ® na escala 0,5 McFarland.
- Distribuir 0,1 mL (100 µl) desta turvação, bem homogeneizada, em cada pocinho da microplaca, com auxílio de uma pipeta estéril. Para uso de pipeta multicanal a Probac do Brasil comercializa separadamente uma canaleta para auxiliar na inoculação.
- Pingar uma gota da solução estabilizante de aminoácidos nos pocinhos dos aminoácidos (A1, A2 e A3).
- Pingar duas gotas de óleo mineral estéril nas provas sublinhadas: Controle dos aminoácidos (A1), L-lisina (A2), L-arginina (A3), Ureia (A12) e DNase (C1).
- Colocar o painel na embalagem e incubar a 35°C± 2°C por 24 horas. Uma segunda leitura deve ser feita com 48 horas, caso a primeira leitura não demonstre alterações bioquímicas que permitam uma identificação adequada verificar as provas que necessitam do uso de reagentes: e neste caso, colocar os reativos necessários para leitura somente antes da leitura de 48 horas.

B) Motilidade

- Inocular parte de uma colônia, com fio de platina, por picada central até 2/3 do meio. Não inocular até o final do tubo. Incubar a 35°C ± 2°C.

C) Crescimento a 42°C

- Semear o meio com uma alçada do inóculo preparado para semear a microplaca fazendo uma estria na superfície do agar inclinado. Incubar a 42°C.

D) Teste do PYR

- Com o auxílio de uma pinça previamente flambada, retirar um disco de PYR do frasco. Utilizar uma pipeta ou um frasco contagotas, impregnar o disco de PYR com água destilada estéril ou água de torneira (o uso de salina torna a reação mais lenta e menos intensa). Depositá-lo sobre uma lâmina ou placa de Petri.
- Com o auxílio de uma alça previamente flambada, fazer um esfregão da bactéria isolada, aguardar 5 minutos a temperatura ambiente e colocar uma gota do PYR Reagente. As reações positivas ocorrem em até 1 minuto.

E) Teste da Oxidase

- Retirar uma fita e fechar imediatamente o frasco. Com bastão de vidro, madeira ou plástico, fazer um esfregão da bactéria a ser identificada na fita. Não utilize nenhum tipo de alça ou bastão que contenha vestígios de ferro, pois este irá catalisar a reação de oxidação do reagente, resultando em reação falso-positiva. Na mesma fita, faça controle positivo com *Pseudomonas aeruginosa* e controle negativo com *E. coli*. Anotar o resultado no painel.

Leitura e Interpretação:

1) Fundamentos das Reações:

- **Indol:** Alguns bacilos Gram negativos possuem a enzima triptofanase e em meios contendo triptofano produzem indol. O indol é um dos produtos de degradação imediata da desaminação do triptofano, e pode ser detectado pela reação com o Reativo de Kovacs, resultando em um composto colorido.
- **Citrato de Simmons:** verifica a utilização do citrato como única fonte de carbono.
- **Hidrólise da uréia:** verifica a presença da enzima urease que hidrolisará a uréia.
- **Triptofano desaminase:** teste usado para verificar a desaminação do triptofano a ácido indolpirúvico, que é detectada pela adição de cloreto férrico.
- **L-Lisina e L-Arginina:** são testes que demonstram a capacidade de um organismo descarboxilar ou dehidrolisar um aminoácido em amina resultando em alcalinidade do meio.
- **Glicose:** determina o metabolismo oxidativo de um organismo ou seu não uso.
- **Utilização do Manitol, Maltose e Lactose:** a utilização via oxidativa de um açúcar, resulta na formação de ácidos que diminuem o pH do meio causando alteração de cor.
- **ONPG:** prova baseada na atividade da β-D-galactosidase, que é uma das enzimas que determina a capacidade da bactéria utilizar lactose.
- **Hidrólise da esculina:** demonstra a capacidade do micro-organismo hidrolisar a esculina resultando em coloração enegrecida do meio.
- **Oxidase:** teste diferencial muito importante na identificação de bactérias Gram negativas. As bactérias que produzem a enzima oxidase apresentam um sistema de transporte de elétrons, denominado *sistema citocromo oxidase*. Neste sistema, os aceptores de elétrons naturais podem ser substituídos por substratos artificiais, que, na presença de oxigênio atmosférico, são oxidados pela citocromo oxidase, formando um composto colorido.
- **Crescimento em NaCl 6,5%:** demonstra a capacidade do micro-organismo crescer ou não na presença de 6,5% de NaCl.
- **Sensibilidade à Polimixina:** demonstra a capacidade do micro-organismo crescer ou não na presença de polimixina.
- **Redução de Nitratos:** demonstra a capacidade de um micro-organismo reduzir nitrato a nitrito ou denitrificar.
- **Crescimento em Agar MacConkey:** demonstra a capacidade do micro-organismo crescer no meio de MacConkey.

SOMENTE PARA USO DIAGNÓSTICO "IN VITRO" Rev.: 04

PROBAC DO BRASIL Produtos Bacteriológicos Ltda.
 Rua Jaguaribe, 35 – Sta. Cecília - São Paulo – SP - CEP: 01224-001
 Fone: 55 11 3367-4777 - Fax: 55 11 3223-8368
 CNPJ 45.597.176/0001-00 -Insc. Est. 110.485.842.111
 Site: www.probac.com.br E-mail: probac@probac.com.br

- **Liquefação da gelatina:** determina a capacidade do micro-organismo excretar uma enzima proteolítica (gelatinase) capaz de degradar a gelatina.
- **Produção de DNase:** detecta a presença da enzima desoxirribonuclease (DNase) capaz de despolimerizar o ácido desoxirribonucléico (DNA).
- **Motilidade:** detecta a presença de flagelos que são as estruturas de motilidade bacteriana.
- **Crescimento a 42°C:** demonstra a capacidade do micro-organismo crescer a 42°C
- **PYR Teste:** A hidrólise enzimática da L-pyrrolidonyl-beta-naphthylamide pela enzima L-pyroglyutamyl-aminopeptidase é verificada através da reação do PYR Reagente com a beta-naphthylamide livre, que forma uma Base de Schiff de coloração vermelha.

2) Revelação das provas:

2.1. Oxidase: A leitura é feita em poucos segundos:

- Oxidase (+): O esfregaço bacteriano na fita apresenta inicialmente uma coloração rosa, e após alguns segundos pode mudar para uma cor púrpura bem escura.
- Oxidase (-): O esfregaço bacteriano não apresenta alteração de cor.

2.2 Pyr Test:

- PYR positivo: O desenvolvimento de cor vermelho-cereja indica resultado positivo.
- PYR negativo: Coloração amarela ou alaranjada indica resultado negativo.

2.3 Motilidade:

- Motilidade (-): Crescimento na estria.
- Motilidade (+): Crescimento além da estria.

2.4 Painel:

Algumas provas bioquímicas necessitam de reagentes, que devem ser adicionados após a incubação, para que o resultado possa ser visualizado:

- **Nitrato (C2):** Pingar 01 gota de Ácido Sulfanílico 0,8% + 01 gota de Dimetil alfanafitilamina 0,5% (seguir a ordem descrita dos reagentes). Desenvolvimento de cor vermelho tijolo logo após adição dos reagentes, indica Reação Positiva. Na ausência de cor, adicionar zinco em pó em pequena quantidade. Se houver desenvolvimento de cor rosa ou vermelha após adição do zinco, o teste é Negativo e ausência de cor indica Reação Positiva (Denitrificação)
 - **Triptofano desaminase (C4):** Pingar 01 gota de Cloreto Férrico 10%.
 - **Indol (C5):** Pingar 02 gotas de Reativo de Kovacs.
- Aguardar 2 minutos antes de realizar a leitura.

2.4.1 Leitura:

Prova	Reação Positiva	Reação Negativa
Lisina e Arginina	Púrpura	Cinza/amarela
Crescimento em NaCl 6,5%	Meio turvo	Meio transparente
Liquefação da Gelatina	Fita transparente	Fita opaca
Hidrólise da esculina	Preto	Inalterado
Utilização de Glicose, Maltose, Lactose e Manitol	Amarela	Azul/Verde
Sensibilidade à Polimixina	Meio Transparente	Meio Turvo
Hidrólise da uréia	Vermelha	Amarela
Produção de DNase	Anel branco leitoso (embaixo da camada de óleo mineral)	Anel azul
Redução de Nitratos	Vermelha	Amarela
Utilização do ONPG	Amarela	Inalterado
Triptofano desaminase	Marrom	Amarela
Produção de Indol	Rosa	Amarelo
Crescimento em MacConkey	Meio turvo	Meio transparente
Utilização Citrato de Simmons	Azul / Verde escuro	Verde amarelada

2.4.2 Resultados: Após a leitura das provas, os resultados devem ser preenchidos no banco de dados que acompanha o produto na primeira compra e é instalado pela Probac ou um de seus distribuidores. O sistema indicará qual o nome e espécie do micro-organismo isolado e sua probabilidade.

2.5 Uso do Banco de Dados:

1. Abrir o Programa Painel para Não Fermentadores.
2. Selecionar: Resultados e identificar a amostra e a data.
3. Na parte superior direita escolher a opção de acordo aos resultados de Motilidade, Oxidase, Indol e Morfologia bacteriana.
4. Na tela que aparecer, colocar os resultados positivos ou e negativo, em cada uma das provas solicitadas, utilizando as teclas - e +.
5. Uma vez colocados todos os resultados na tela, clicar em Salvar. Na parte inferior da tela aparece o resultado da identificação do isolado e sua probabilidade.
6. Clicar a opção imprimir, para enviar o resultado ao requisitante do exame.

SOMENTE PARA USO DIAGNÓSTICO "IN VITRO" Rev.: 04

7. O sistema permite a consulta, visualização e impressão dos resultados e ou relatórios obtidos em determinado período.

Notas:

1. Quando a bactéria cresce no pocinho da polimixina, isto significa que ela é resistente a este antibiótico. O resultado deve ser informado como -. Se não cresce, ela é considerada sensível e o resultado deve ser informado como +. Este resultado pode não se correlacionar com o resultado encontrado no teste de susceptibilidade.
2. Resultados com 80 % ou mais de probabilidade podem ser informados sem a necessidade de reações suplementares.
3. Com resultados de menor probabilidade (< 80%), checar a pureza da cepa, e a acurácia da leitura das reações. Se mesmo assim persistir o resultado não conclusivo, enviar a cepa para Probac do Brasil, para o auxílio nesta identificação.

Em caso de não aparecer nenhum nome de bactéria na tela:

Checar os resultados lidos e marcados no computador.

- A) Checar a pureza da cepa.
- B) Checar se é um bacilo Gram negativo não fermentador de glicose.

Cuidados:

- Não utilizar painéis sem embalagem íntegra ou ausência do dessecante.
- Não utilizar o produto na presença de sinais de contaminação.

Observação: Materiais não fornecidos juntamente com o painel:

- Escala de McFarland.
- Canaleta para auxiliar na inoculação com pipeta multicanal.
- Tubos estéreis (não disponível para venda).
- Zinco em pó

Apresentação: Caixa com 10 painéis, 01 frasco com 10 fitas de Oxidase, 01 frasco de Solução Inoculante com 50 mL, Reagentes (Reativo de Kovacs e Peptidase, Cloreto Férrico 10%, Ácido Sulfanílico 0,8% e Dimetil alfanafitilamina 0,5%), Solução Estabilizante de Aminoácidos e Óleo Mineral.

Conservação:

Painel, Óleo Mineral, Ácido Sulfanílico 0,8%, Dimetil alfanafitilamina 0,5% e Solução Inoculante: Conservar entre 10° e 25°C.
Fitas de Oxidase: Conservar entre 2°C e 8°C, ao abrigo da luz.

Reagentes (PYR Test, Cloreto Férrico 10%, Reativo Kovacs) e Solução Estabilizante de Aminoácidos: Conservar entre 2°C e 8°C.

Validade: 3 meses.

Precauções: Após o uso, o produto deverá ser descartado seguindo-se as normas vigentes de resíduos de serviços de saúde.

Referências Bibliográficas:

1. Murray, P.R. et al. – Manual of Clinical Microbiology, 9th ed., ASM Press, Washington, DC, 2007.
2. Guia de Identificação da Loyola University Chicago, na Publicação de Paul C. Schreckenberger, 2007
3. Washington, W.J.; Allen, S.D. et al- Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th Edition. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2006.

SOMENTE PARA USO DIAGNÓSTICO "IN VITRO" Rev.: 04