

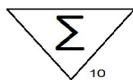
Indicações

Painel para identificação de Bacilos Gram negativos não fermentadores de Glicose.

Apresentação



NFIII



Demonstração das Provas Bioquímicas:

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

Caixa com 10 Painéis, 01 frasco com 10 fitas de Oxidase, 01 frasco de Solução Inoculante com 50 mL, Reagentes: Reativo de Kovacs, Reativo de Peptidase, Cloreto Férrico 10%, Ácido Sulfanílico 0,8%, Dimetil Alfanaftalamina 0,5%, Solução Estabilizante de Aminoácidos, Óleo Mineral, 10 Tubos de prova de Motilidade e 10 Tubos de prova de Crescimento a 42°C.

Composição

Lisina, Arginina, Cloreto de Sódio, Gelatina, Esculina, Glicose, Maltose, Lactose, Manose, Polimixina b, Uréia, Agar DNase, Nitrato, Triptofano, Agar Macconkey, Agar Citrato de Simmons, Indol, β-D-Galactosidase, Reativo de Kovacs, Reativo de Peptidase, Cloreto Férrico 10%, Ácido Sulfanílico 0,8%, Dimetil Alfanaftalamina 0,5%, Solução Estabilizante de Aminoácidos, Óleo Mineral, Agar Bacteriológico e Água Purificada.

Princípio

O Kit NFIII é constituído por uma placa de microtitulação com 19 provas: Descarboxilação da Lisina, Arginina, Controle, Crescimento em NaCl 6,5%, Agar MacConkey; Liquefação da Gelatina, Hidrólise da Esculina, Uréia, Fermentação da Glicose, Maltose, Lactose, Manitol, Citrato e ONPG, Produção de Indol, DNase; Sensibilidade à polimixina B, Redução de Nitrato e Desaminação da Fenilalanina.

Disposição das Provas Bioquímicas no Painel:

Painel	Provas	Abreviação
A1	Controle dos Aminoácidos	CON
A2	L-Lisina	LIS
A3	L-Arginina	ARG
A4	Crescimento em NaCl a 6,5%	NaCl
A5	Prova da Gelatinase	GEL
A6	Hidrólise da Esculina	ESC
A7	Fermentação da Glicose	GLI
A8	Fermentação da Maltose	MAL
A9	Fermentação da Lactose	LAC
A10	Fermentação do Manitol	MAN
A11	Sensibilidade a Polimixina B	POL
A12	Hidrólise da Uréia	URE
B1	Teste de DNase	DNA
B2	Redução de Nitrato	NIT
B3	Fermentação 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

Além dos testes realizados na placa de microtitulação, o Painel acompanha testes adicionais, como:

Prova realizada em tubos: 10 tubos para realização do teste de motilidade e crescimento a 42°C.

Prova realizada em disco: 10 fitas e um reativo para o teste de PYR.

Prova realizada em fita: 10 fitas para teste de Oxidase.

Aplicativo com banco de dados para diagnóstico informatizado com cálculo de probabilidade do isolado. 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 microrganismo em uma das opções abaixo citadas permitindo introduzir somente os resultados necessários solicitados pelo aplicativo:

- 1) Oxidase negativa e Motilidade negativa;
- 2) Oxidase negativa e Motilidade positiva;
- 3) Oxidase positiva e Motilidade negativa: cocos;
- 4) Oxidase positiva e Motilidade negativa: bacilos, Indol positivo;
- 5) Oxidase positiva e Motilidade negativa: bacilos, Indol negativo;
- 6) Oxidase positiva e Motilidade positiva.

Controle de Qualidade

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

Cepas*	Probabilidade
<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 25416	> 80%
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC 13637	> 80%
* Inóculo 10 ⁶ UFC	

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

Procedimento

Os testes deverão ser realizados a partir de colônias isoladas, puras e sabidamente não fermentadoras de Glicose.

A) Painel

- 1) Abrir a embalagem primária do Painel (envelope plástico);
- 2) Guardar o envelope para incubação do Painel posteriormente;
- 3) Turvar 3 a 4 mL da solução inoculante Probac do Brasil® na escala 0,5 McFarland, com o microrganismo previamente isolado;
- 4) Distribuir 0,1 mL (100 µl) desta solução, homogeneizada, com auxílio de uma pipeta em cada cavidade do painel;
- 5) Adicionar uma gota da solução estabilizante de aminoácidos nas cavidades referente aos aminoácidos A1, A2 e A3;
- 6) Adicionar duas gotas de óleo mineral estéril nas provas sublinhadas: Controle dos aminoácidos (A1), L-Lisina (A2), L-Arginina (A3), Uréia (A12) e DNase (B1);
- 7) Retornar o Painel para sua embalagem original e incubar a 35,0°C ± 2,0°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;
- 8) 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) Prova de 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 35,0°C ± 2,0°C.

C) Prova do Crescimento a 42°C

Semear o meio com uma alçada do inóculo preparado para semear a placa de microtitulação fazendo uma estria na superfície do Agar inclinado. Incubar a 42° C.



D) Teste do PYR

- 1) Com o auxílio de uma pinça previamente flambada, retirar um disco de PYR do frasco. Utilizar uma pipeta ou um frasco conta-gotas, impregnar o disco de PYR com água destilada estéril (o uso de salina torna a reação mais lenta e menos intensa);
- 2) Depositá-lo sobre uma lâmina ou placa de Petri;
- 3) Com o auxílio de uma alça previamente flambada, fazer um esfregaço 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 esfregaço 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 *Escherichia coli*. Anotar o resultado no painel.

Interpretação dos Resultados

1) Fundamentos das Reações:

Indol: Alguns Bacilos Gram negativos possuem a enzima Triptofanase e em meios contendo Triptofano produzem o 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 de coloração rosácea.

Citrato de Simmons: verifica a utilização do Citrato como única fonte de carbono.

Hidrólise da Uréia: verifica a presença da enzima urease que hidrolisa 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 do microrganismo descarboxilar ou dehidrolisar um Aminoácido em Amina resultando em alcalinidade do meio.

Glicose: determina o metabolismo oxidativo de um microrganismo 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 microrganismo 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 microrganismo crescer ou não na presença de 6,5% de NaCl.

Sensibilidade à polimixina b: demonstra a capacidade do microrganismo crescer ou não na presença de polimixina.

Redução de Nitratos: demonstra a capacidade de um microrganismo reduzir Nitrato a Nitrito ou de nitrificar.

Crescimento em Agar MacConkey: demonstra a capacidade de o microrganismo crescer no meio Agar MacConkey.

Liquefação da Gelatina: determina a capacidade do microrganismo 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 microrganismo crescer a 42°C.

PYR Teste: A hidrólise enzimática da L-pyrrolidonyl-beta-naphtylamide pela enzima L-pyroglyutamyl-aminopeptidase é verificada através da reação do PYR Reagente com a beta-naphtylamide livre, que forma uma Base de Schiff de coloração vermelha.

2) Revelação das Provas

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.

PYR Test:

PYR positivo: O desenvolvimento de cor vermelho-cereja indica resultado positivo.

PYR negativo: Coloração amarela ou alaranjada indica resultado negativo.

Motilidade:

Motilidade (-): Crescimento na estria.

Motilidade (+): Crescimento além da estria.

Painel:

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

Nitrato (B2): Adicionar 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 (B4): Pingar 01 gota de Cloreto Férrico 10%.

Indol (B5): Pingar 02 gotas de Reativo de Kovacs.

Aguardar 2 minutos antes de realizar a leitura.

Interpretação das cores após período de incubação:

GUIA DE CORES PARA INTERPRETAÇÃO DE REAÇÕES POSITIVAS DO PAINEL												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
	CON	LIS	ARG	NaCl	GEL	ESC	GLI	MAL	LAC	MAN	POL	URE
B												
	DNA	NIT	ONP	FEN	IND	MAC	CIT					

As provas NaCl, POL e MAC apresentam turvação do meio quando há crescimento.

Prova	Reação +	Reação -
LIS e ARG	Púrpura	Cinza/Amarela
NaCl	Meio Turvo	Meio Transparente
GEL	Fita transparente	Fita opaca
ESC	Negro	Inalterado
GLI, MAL, LAC e MAN	Amarela	Verde
POL	Meio transparente	Meio turvo
URE	Vermelho	Amarelo
DNA	Anel branco leitoso	Anel azul
NIT	Vermelho	Amarelo
ONP	Amarela	Inalterado
FEN	Marrom	Amarela
IND	Rosa	Amarelo
MAC	Meio turvo	Meio transparente
CIT	Azul	Amarelo

Após a leitura das provas, os resultados devem ser preenchidos no banco de dados do programa que acompanha o produto. O Programa está disponível em CD que acompanha o produto na primeira compra ou pode ser baixado diretamente do site www.probac.com.br. O sistema indicará qual o nome e espécie do microrganismo isolado e sua probabilidade.



3) 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.
- 7) O sistema permite a consulta, visualização e impressão dos resultados e ou relatórios obtidos em determinado período.

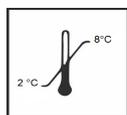
2. Guia de Identificação da Loyola University Chicago, na Publicação de Paul C. Schreckenberger, 2007
3. Washington, W.J.; Allen, S.D. et al- Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th Edition. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2006.

Notas:

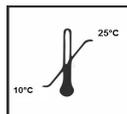
- 1) Quando houver crescimento na cavidade que contém polimixina B, significa que o mesmo é resistente ao antibiótico, e o resultado deverá ser informado como negativo (-).
- 2) Se não houver crescimento, o microrganismo é considerado sensível, e o resultado deve ser informado como positivo (+). Este resultado pode não se correlacionar com o resultado encontrado no teste de susceptibilidade.
- 3) Resultados com 80 % ou mais de probabilidade podem ser informados sem a necessidade de reações suplementares.
- 4) 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:

- 1) Checar os resultados lidos e marcados no computador.
- 2) Checar a pureza da Cepa.
- 3) Checar se é um bacilo Gram negativo não fermentador de glicose.

Conservação

Conservar de 2° a 8°C:
Fitas de Oxidase, PYR Test, Cloreto Férrico 10%, Reativo Kovacs e Solução Estabilizante de Aminoácidos.



Conservar de 10° a 25°C:
Painel, Óleo Mineral, Ácido Sulfanílico 0,8%, Dimetil alfanafilamina 0,5% e Solução Inoculante.

Validade

3 meses a partir da data de fabricação.

Precauções

Não utilizar Painéis caso a embalagem estiver violada ou presença de sinais de contaminação.
Após a realização dos testes, este material deverá ser descartado conforme as recomendações vigentes para resíduos em serviços de saúde.

Referências Bibliográficas:

1. Murray, P.R. et al. – Manual of Clinical Microbiology, 9th ed., ASM Press, Washington, DC, 2007.

SOMENTE PARA USO "IN VITRO" Rev.: 06



PROBAC DO BRASIL Produtos Bacteriológicos Ltda.
Rua Jaguaribe, 35 – Santa Cecília - São Paulo – SP
CEP: 01224-001 Fone: 55 11 3367-4777
CNPJ 45.597.176/0001-00 - Insc. Est. 110.485.842.111
Responsável Técnico: Francisco Donizeti Montagnoli CRF/SP: 47.534
Site: www.probac.com.br email: probac@probac.com.br