



PROCEDIMENTOS DE CONTROLO DE QUALIDADE

I INTRODUÇÃO

O Ágar de ferro lisina é um meio diferencial para a identificação de bacilos entéricos.

II PROCEDIMENTO DO TESTE DE DESEMPENHO

1. Inocule as amostras representativas com as culturas listadas abaixo.
 - a. Com uma agulha de inoculação inocule as amostras, perfurando o fundo e fazendo riscas sobre a superfície. Utilize diluições de 10^{-1} de culturas em **Trypticase** Soy Broth, com 18 a 24 h, dos microrganismos listados abaixo.
 - b. Incube com as tampas desapertadas a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$, numa atmosfera aeróbia.
2. Examine os tubos após 18 a 24 h, verificando se existe crescimento e se ocorreram reacções.
3. Resultados esperados

	Superfície inclinada do ágar	Fundo do ágar	H ₂ S
* <i>Salmonella enterica</i> subespécie <i>arizonae</i> ATCC 13314	Alcalina (púrpura)	Alcalino (púrpura)	+
* <i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8454	Alcalina (púrpura)	Ácido (amarelo)	+ ou -
* <i>Proteus vulgaris</i> ATCC 9484	Vermelho	Ácido (amarelo)	-

*Estirpe do microrganismo recomendada para o controlo de qualidade do utilizador.

III CONTROLO DE QUALIDADE ADICIONAL

1. Examine os tubos, conforme descrito na secção "Deterioração do produto".
2. Examine visualmente os tubos representativos, para assegurar que eventuais defeitos físicos não irão interferir com a utilização.
3. Incube os tubos representativos não inoculados entre 20 a 25°C e 30 a 35°C e examine-os após 7 dias, verificando se existe contaminação microbiana.

INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO

IV UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O Ágar de ferro lisina é utilizado para diferenciação de microrganismos entéricos com base na sua capacidade de descarboxilação ou desaminação da lisina, formando ácido sulfídrico.

V RESUMO E EXPLICAÇÃO

Edwards e Fife criaram o Ágar de ferro lisina para detecção de culturas de Arizona (hoje me dia conhecida como *Salmonella enterica* subespécie *arizonae*), especialmente aquelas que fermentam rapidamente a lactose.¹ Este desenvolvimento acompanhou a promulgação por Ewing e Edwards de um esquema taxonómico para as *Enterobacteriaceae*, no qual foi definida a divisão e os grupos principais dentro desta família e foram descritos os procedimentos de diferenciação.² Os vários critérios de identificação de culturas foram resumidos por Edwards e Ewing no seu tratado sobre *Enterobacteriaceae*.³ Contudo, a taxonomia desta família mudou dramaticamente nos últimos anos.⁴⁻⁶

Johnson et al. utilizaram o Ágar de ferro lisina e o Ágar de ferro de Kligler para a diferenciação primária de vários grupos de bactérias da família *Enterobacteriaceae* e uma combinação de Ágar de ferro lisina e Ágar de ferro com três açúcares para a identificação de *Salmonella*, *Shigella* e microrganismos do grupo *Arizona*, a partir das fezes.⁷

O Ágar de ferro lisina ajuda na diferenciação de bacilos entéricos com base na sua capacidade de descarboxilação e desaminação da lisina para produzir ácido sulfídrico. Foi concebido para ser utilizado com outros meios (p. ex., Ágar de ferro com três açúcares) em esquemas de identificação apropriados.

VI PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

A dextrose serve como uma fonte de hidratos de carbono fermentáveis. O indicador de pH, púrpura de bromocresol, muda para cor amarela num pH inferior ou igual a 5,2 e tem cor púrpura num pH igual ou superior a 6,8.⁸ O citrato de amónio férrico e o tiosulfato de sódio são indicadores da formação de ácido sulfídrico. A lisina é o substrato utilizado para detectar as enzimas lisina descarboxilase e lisina desaminase.

As culturas de bacilos entéricos que produzem ácido sulfídrico causam o escurecimento do meio devido à produção de sulfuretos férricos. As culturas que produzem lisina descarboxilase originam uma reacção alcalina (cor púrpura) ou neutra no fundo do meio. Os microrganismos que causam a desaminação da lisina originam o desenvolvimento de uma superfície inclinada vermelha sobre um fundo ácido. Poderá ocorrer a formação de gás, que é muitas vezes irregular ou suprimida.

VII REAGENTES

Lysine Iron Agar

Fórmula* aproximada por litro de água purificada

Digerido pancreático de gelatina	5,0 g
Extracto de leveduras	3,0 g
Dextrose	1,0 g
L-lisina	10,0 g
Citrato de amónio férrico.	0,5 g
Tiosulfato de sódio.....	0,04 g
Púrpura de bromocresol.....	0,02 g
Ágar	13,5 g

*Ajustada e/ou suplementada conforme necessário para cumprir os critérios do desempenho.

Advertências e Precauções

Para diagnóstico *in vitro*.

Os tubos com tampas apertadas devem ser abertos com cuidado, para evitar lesões devido a quebra do vidro.

Utilizar técnicas assépticas e cumprir as precauções estabelecidas contra perigos microbiológicos em todos os procedimentos. Antes de serem eliminados, esterilizar em autoclave os tubos preparados, os recipientes de amostras e outros materiais contaminados.

Instruções de armazenamento

Após a recepção, armazenar os tubos em local escuro entre 2 e 8°C. Evitar congelar ou aquecer excessivamente. Abrir apenas quando estiver pronto a utilizar. Minimizar a exposição à luz. Os tubos com meio que forem armazenados conforme indicado no rótulo até ao momento imediatamente anterior à sua utilização, podem ser inoculados até ao fim do prazo de validade e incubados durante os períodos de incubação recomendados. Antes da inoculação, deixar o meio aquecer até à temperatura ambiente.

Deterioração do produto

Não utilizar tubos que apresentem sinais de contaminação microbiana, descoloração, secagem ou outros sinais de deterioração.

VIII COLHEITA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

As amostras adequadas para cultura podem ser preparadas utilizando várias técnicas. Para obter informações pormenorizadas, consulte os textos apropriados.^{9,10} As amostras devem ser obtidas antes de serem administrados agentes antimicrobianos. Devem tomar-se as providências necessárias para a entrega imediata no laboratório.

IX PROCEDIMENTO

Material fornecido

Lysine Iron Agar Slants

Material necessário mas não fornecido

Meios de cultura auxiliares, reagentes, microrganismos de controlo da qualidade e equipamento laboratorial, conforme necessário.

Procedimento do teste

Utilize técnicas assépticas.

Utilize uma agulha de inoculação para perfurar o fundo do ágar duas vezes e, em seguida, fazer riscos sobre a superfície inclinada do ágar com uma cultura pura. Incube os tubos com as tampas pouco desapertadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 18 a 48 h, numa atmosfera aeróbia.

Devem ser inoculados em paralelo Triple Sugar Iron Agar Slants, a não ser que já tenham sido obtidos resultados deste meio para distinguir coliformes de *Shigella*, por exemplo.

Controlo de qualidade pelo utilizador

Consulte "Procedimentos do controlo de qualidade".

Os requisitos do controlo de qualidade devem ser efectuados de acordo com os regulamentos ou requisitos de acreditação europeus e/ou nacionais aplicáveis e com os procedimentos padrão de controlo de qualidade do seu laboratório. É recomendado que o utilizador consulte as normas do CLSI e os regulamentos da CLIA que dizem respeito a este assunto, para obter orientações sobre práticas de controlo de qualidade apropriadas.

X RESULTADOS

A descarboxilação da lisina é detectada no fundo do ágar por uma reacção alcalina (púrpura). A desaminação da lisina é detectada pela cor vermelha da superfície inclinada do ágar. A produção de ácido sulfídrico é detectada pela formação de um precipitado negro. Uma reacção negativa (superfície inclinada do ágar púrpura e fundo amarelo) indica apenas a fermentação da dextrose.⁸

O ácido sulfídrico pode não ser detectado neste meio por microrganismos que sejam negativos para a actividade da lisina descarboxilase, uma vez que a produção ácida no fundo do ágar poderá suprimir a sua formação.⁸ Por este motivo, as espécies de *Proteus* produtoras de H_2S não escurecem este meio.⁸

Reacções típicas dos membros da família *Enterobacteriaceae*:

	Superfície inclinada do ágar	Fundo do ágar	H_2S
Grupo <i>Arizona</i>	Alcalina.....	Alcalina.....	+
		ou neutra	
<i>Salmonella enterica</i>	Alcalina.....	Ácida.....	-
subespécie <i>enterica</i>			
serótipo Paratyphi A			
Outras salmonelas.....	Alcalina.....	Alcalina.....	+
<i>Shigella</i>	Alcalina.....	Ácida.....	-
<i>Citrobacter</i>	Alcalina.....	Ácida.....	+ ou -
<i>Klebsiella</i>	Alcalina.....	Alcalina.....	-
	ou neutra	ou neutra	
<i>Escherichia</i>	Alcalina.....	Alcalina.....	-
		ou neutra*	
<i>Proteus</i>	Vermelha.....	Ácida.....	-
<i>Providencia</i>	Vermelha.....	Ácida.....	-

Chave: Alcalina = cor púrpura • Ácida = cor amarela • Neutra = cor cinzenta azulada

*Uma reacção alcalina ou neutra indica descarboxilação.

XI LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Para a identificação, os microrganismos devem ser uma cultura pura. Para uma identificação final, devem ser efectuados testes morfológicos, bioquímicos e/ou serológicos. Para obter informações pormenorizadas e sobre os procedimentos recomendados, consulte os textos apropriados.^{5,9,10}

XII CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

Antes de serem comercializados, todos os lotes de Lysine Iron Agar Slants são testados relativamente às características do desempenho. As amostras representativas do lote são testadas através da inoculação, fazendo riscos sobre o ágar inclinado e perfurando o fundo com uma agulha de inoculação, com culturas de *Salmonella arizonae* (ATCC 13314), *Proteus vulgaris* (ATCC 9484) e *Citrobacter freundii* (ATCC 8454) em *Trypticase* Soy Agar ou diluídas a 10^{-1} de *Trypticase* Soy Broth. Os tubos são incubados com as tampas desapertadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ e devem ser lidos após 18 a 24 h, verificando se existe crescimento e se ocorreram reacções. O crescimento de todos os microrganismos é moderado a intenso. A *S. arizonae* efectua a descarboxilação da lisina, o que é

indicado por uma reacção alcalina (cor púrpura) na superfície inclinada e no fundo do ágar, e é positiva para a produção de ácido sulfídrico, o que é indicado pelo escurecimento do meio. O *P. vulgaris* efectua a desaminação da lisina, indicado por uma reacção com cor vermelha na superfície inclina enquanto que o fundo permanece ácido (cor amarela), e é negativo para a produção de ácido sulfídrico. O *C. freundii* é negativo para a desaminação e descarboxilação da lisina, produzindo uma reacção alcalina na superfície inclinada e uma reacção ácida no fundo do ágar (cor amarela), o que indica a fermentação de dextrose, podendo ou não produzir ácido sulfídrico.

XIII APRESENTAÇÃO

N.º de cat.	Descrição
220952	BD BBL Lysine Iron Agar Slants, emb. com 10 tubos K
220953	BD BBL Lysine Iron Agar Slants, caixa com 100 tubos K
297700	BD BBL Lysine Iron Agar Slants, caixa com 100 tubos D

XIV BIBLIOGRAFIA

1. Edwards, P.R., and M.A. Fife. 1961. Lysine-Iron Agar in the detection of *Arizona* cultures. Appl. Microbiol. 9:478-480.
2. Ewing, W.H., and P.R. Edwards. 1960. The principal divisions and groups of *Enterobacteriaceae* and their differentiation. Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon. 10:1-12.
3. Edwards, P.R., and W.H. Ewing. 1962. Identification of *Enterobacteriaceae*, Burgess Publishing Co., Minneapolis.
4. Ewing, W.H. 1986. Edwards and Ewing's identification of *Enterobacteriaceae*, 4th ed. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York.
5. Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams (ed.). 1994. Bergey's Manual™ of determinative bacteriology, 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
6. Farmer, J.J., III. 1999. *Enterobacteriaceae*: introduction and identification, p. 442-458. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
7. Johnson, J.G., L.J. Kunz, W. Barron, and W.H. Ewing. 1966. Biochemical differentiation of the *Enterobacteriaceae* with the aid of Lysine-Iron-Agar. Appl. Microbiol. 14:212-217.
8. MacFaddin, J.F. 1985. Media for isolation-cultivation- identification-maintenance of medical bacteria, vol. I. Williams & Wilkins, Baltimore.
9. Murray, P.R., E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller and R.H. Tenover (ed.). 2003. Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
10. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.

Assistência Técnica e Suporte da BD Diagnostics: contacte o representante local da BD ou visite www.bd.com/ds.



Becton, Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, MD 21152 USA



Benex Limited
Pottery Road, Dun Laoghaire
Co. Dublin, Ireland

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.

BD, BD Logo, BBL, GasPak and Trypticase are trademarks of Becton, Dickinson and Company. ©2014 BD.