

NEWPLUS I

Kit para controle microbiológico de cosméticos e matérias-primas afins (contagem de mesófilos, coliformes totais e fungos)

NOME TÉCNICO

KIT PARA CONTROLE MICROBIOLÓGICO DE COSMÉTICOS

APRESENTAÇÃO

Caixa com 08 testes – Cód. PA151

Contém 8 espátulas estéreis, 8 pipetas estéreis graduadas de 1 mL, 8 tubos de Caldo Letheen, 8 placas 60x10 mm de Ágar Letheen, 8 placas 60x10 mm de Ágar Mac Conkey e 8 placas 60x10 mm de Ágar Sabouraud dextrose.

COMPOSIÇÃO

Formulação	g/L
PA 72 - CALDO LETHEEN 9mL	
Peptona bacteriológica	10,0
Extrato de carne	5,0
Tween 80	5,0
Lecitina	0,7
Cloreto de sódio	5,0
Água purificada	1000 mL
PA 13 - ÁGAR LETHEEN 60X10 mm	
Peptona de caseína	5,0
Dextrose	1,0
Extrato de carne	3,0
Tween 20	7,0
Lecitina	1,0
Ágar bacteriológico	15,0
Água purificada	1000 mL
PA 14 - ÁGAR MAC CONKEY 60X10 mm	
Peptona de caseína	1,5
Peptona de gelatina	17,0
Peptona de carne	1,5
Cloreto de sódio	5,0
Lactose	10,0
Sais biliares: n.º 3	1,5
Cristal violeta	0,001
Vermelho neutro	0,03
Ágar bacteriológico	13,5
Água purificada	1000 mL
PA 25 - ÁGAR SABOURAUD DEXTROSE 60X10 MM	
Peptona de caseína	5,0
Peptona de carne	5,0
Dextrose	40
Ágar Bacteriológico	15
Água Purificada	1000 mL

REGISTRO NO MINISTÉRIO DA SAÚDE:
ISENTO

ARMAZENAMENTO

Conservar o produto sob refrigeração (2 a 8° C).
Válido por 120 dias após a fabricação.
Verificar o prazo de validade na embalagem.
Nunca utilizar produtos com validade expirada.

TRANSPORTE

O produto pode ser transportado em temperatura ambiente (10 a 30° C) por até 120 horas.

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

Não aplicável

INFORMAÇÕES TÉCNICAS

- FINALIDADE

Os kits NEWPLUS I e II foram desenvolvidos para atender as exigências para o controle de qualidade microbiológico de produtos de higiene pessoal, cosméticos e matérias-primas utilizadas na indústria cosmecêutica e farmácias de manipulação, estabelecidos pela Resolução 481, de 23 de setembro de 1999, da ANVISA.

O kit NEWPLUS I é destinado à contagem de micro-organismos mesófilos totais aeróbios (TVC: *Total Viable Count*). Fornece também a contagem de coliformes totais e de fungos. Pode ser utilizado para o controle de qualidade de cosméticos e matérias-primas afins, bem como pode ser adaptado para o controle microbiológico de medicamentos.

Finalidade dos meios constituintes do kit:

Ágar Letheen: é um meio não seletivo que permite o desenvolvimento de bactérias aeróbias estritas e facultativas. Contém substâncias neutralizadoras (Lecitina, Tween e outras) que inibem a ação da grande maioria dos conservantes químicos presentes nos cosméticos.

Ágar MacConkey: trata-se de um ágar seletivo e diferencial que inibe o crescimento de bactérias gram-positivas, possibilitando assim um melhor desenvolvimento das bactérias gram-negativas, especialmente os coliformes totais pertencentes às enterobactérias. O ágar favorece o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*.

Ágar Sabouraud dextrose: meio muito utilizado para o isolamento de fungos sejam eles leveduriformes ou filamentosos.

Caldo Letheen: é um caldo nutritivo a base de peptonas, lecitina e Tween. Tem por finalidade diluir o cosmético, enriquecer e recuperar bactérias injuriadas, principalmente os micro-organismos patogênicos (que serão isolados no kit NEWPLUS II), bem como neutralizar os conservantes químicos presentes no produto analisado.

- AMOSTRA

Produtos cosméticos acabados, matérias-primas da indústria cosmecêutica e medicamentos manipulados em farmácias de manipulação.

- TÉCNICA DE USO

INOCULAÇÃO

1- Aliquotizar assepticamente um mililitro ou um grama do produto a ser analisado com auxílio da pipeta estéril, se a amostra for líquida, ou da espátula estéril, se a amostra for sólida;

2- Transferir a amostra para o tubo contendo caldo Letheen, tomando o cuidado de flambar (ou descontaminar com álcool 70%) a boca do mesmo, assim que abri-lo e antes de fechá-lo. Agitar energeticamente o tubo em um agitador tipo Vórtex, até observar a dissolução completa da amostra, obtendo assim um fator de diluição = 10^1 ;

3- Para produtos com alto poder inibitório sobre micro-organismos (p.ex.: xampus e extratos alcoólicos) recomenda-se uma segunda diluição da amostra antes da inoculação em placas. Este passo é realizado transferindo 1 mL do Caldo Letheen, já contendo o cosmético diluído, para outro tubo de Caldo Letheen. Deste modo obtém-se um caldo com uma concentração de ativos bastante reduzida e que permitirá então o desenvolvimento microbiano. Nestas situações o fator de diluição é 10^2 .

4- Após a homogeneização da amostra, transferir 500 microlitros (0,5 mL) do caldo, utilizando a pipeta estéril, para uma placa de Ágar Mac Conkey. Repetir a inoculação em uma placa de Ágar Sabouraud dextrose e uma de Ágar Letheen. Com movimentos rotatórios lentos, distribuir os inóculos por toda a superfície das placas. Este passo pode ser facilitado com o uso de uma alça de Drigalski. Nesta etapa o fator de diluição final (FD_f) será $2 \times 10^1 = 20$, se utilizado um tubo de caldo Letheen ou (FD_f) $2 \times 10^2 = 200$, se utilizados dois tubos de caldo Letheen.

OBS.:

- Recomenda-se que toda a técnica de inoculação seja realizada em câmara asséptica ou em cabine de fluxo laminar.

INCUBAÇÃO

Incubar as placas de Ágar Mac Conkey e Ágar Letheen e o restante do Caldo Letheen, em estufa microbiológica a $35 \pm 2^\circ \text{C}$ por 24 a 48 horas.

Incubar a placa de Ágar Sabouraud dextrose à temperatura ambiente (15 a 30° C) por até 7 dias.

LEITURA E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Observar diariamente se houve desenvolvimento microbiano. Caso positivo, proceder à contagem de colônias.

Para obter a quantidade de micro-organismos presentes na amostra em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mililitro ou por grama do produto, proceder conforme a seguir:

1- Bactérias Mesófilas em UFC/mL ou UFC/g:

Nº de colônias do Ágar Letheen x FD_f = nº de colônias do Ágar Letheen x 20
Nº de colônias do Ágar Letheen x FD_f = nº de colônias do Ágar Letheen x 200, se realizado dupla diluição.

2- Bolores e leveduras em UFC/mL ou UFC/g:

Nº de colônias do Ágar Sabouraud dextrose x FD_f = nº de colônias do Ágar Sabouraud dextrose x 20
Nº de colônias do Ágar Sabouraud x FD_f = nº de colônias do Ágar Sabouraud x 200, se realizado dupla diluição.

3- Gram-negativos em UFC/mL ou UFC/g:

Nº de colônias róseo-vermelhas no Ágar Mac Conkey x FD_f = nº de colônias róseo-vermelhas do Ágar Mac Conkey x 20
Nº de colônias róseo-vermelhas no Ágar Mac Conkey x FD_f = nº de colônias róseo-vermelhas do Ágar Mac Conkey x 200, se realizado dupla diluição.

OBS: Colônias róseo-vermelhas (lactose positivas) no Ágar Mac Conkey são muito sugestivas de coliformes totais e/ou fecais. A confirmação deve ser feita através de provas bioquímicas específicas (Mini-kit ou kit para enterobactérias - NEWPROV) ou por laboratório especializado.

VALORES LIMÍTROFES

Segundo a Resolução nº 481, de 23 de setembro de 1999 (DOU de 06/10/1999) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, os limites sugeridos para cosméticos são:

1- Produtos para a área dos olhos, de uso infantil ou que entram em contato com mucosas:

Mesófilos: $\leq 10^2$ UFC/grama ou mL. Limite máximo: 5×10^2 UFC/grama ou mL.

2- Demais produtos:

Mesófilos: $\leq 10^3$ UFC/grama ou mL. Limite máximo: 5×10^3 UFC/grama ou mL.

Todos os produtos devem apresentar ausência de patógenos (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, coliformes totais e fecais) em um grama ou um mililitro de produto final e ausência de Clostrídio Sulfito redutores em 1 grama de produto (exclusivamente para talcos).

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 em contato com a 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. Sugere-se a utilização dos sacos de autoclave Esteriprov PA291 e 292 (20 e 50 litros, respectivamente).

CONTROLE DE QUALIDADE

Recomenda-se que seja realizado na implantação do kit validação da metodologia com cada grupo de produtos, utilizando técnica apropriada, com as seguintes cepas: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

ANÁLISES CALDO LETHEEN	RESULTADO ESPERADO
pH final a 25° C	7,2 $\pm$ 0,2
Aspecto final	Caldo âmbar claro translúcido
Desempenho microbiológico E. coli ATCC 25922 Inóculo ~ 10.000 UFC	Crescimento bom a excelente
Desempenho microbiológico S. aureus ATCC 6538 Inóculo ~ 10.000 UFC	Crescimento bom a excelente
Esterilidade	Ausência de crescimento
ANÁLISES ÁGAR LETHEEN	RESULTADO ESPERADO
pH final a 25° C	7,2 $\pm$ 0,2
Aspecto final	Caldo âmbar claro translúcido
Desempenho microbiológico E. coli ATCC 25922 Inóculo ~ 10.000 UFC	Crescimento bom a excelente
Desempenho microbiológico S. aureus ATCC 6538 Inóculo ~ 10.000 UFC	Crescimento bom a excelente
Esterilidade	Ausência de crescimento
ANÁLISES ÁGAR MAC CONKEY	RESULTADO ESPERADO
pH final a 25° C	7,1 $\pm$ 0,2
Aspecto final	Meio rosado translúcido, ligeiramente opalescente
Desempenho microbiológico E. coli ATCC 25922 Inóculo ~ 10.000 UFC	Crescimento excelente de colônias vermelhas com precipitado de bile
Desempenho microbiológico P. mirabilis ATCC 25933 Inóculo ~ 10.000 UFC	Crescimento excelente de colônias incolores, sem swarming
Desempenho microbiológico E. faecalis ATCC 29212 Inóculo ~ 10.000 UFC	Crescimento ausente
Esterilidade	Ausência de crescimento
ANÁLISES ÁGAR SABOURAUD DEXTROSE	RESULTADO ESPERADO
pH final	5,6 $\pm$ 0,2
Aspecto final	Meio âmbar claro, ligeiramente opalescente
Desempenho microbiológico C. albicans ATCC 10231 Inóculo ~ 10.000 UFC	Crescimento bom a excelente de colônias brancas

Desempenho microbiológico A. brasiliensis ATCC 16404 Inóculo ~ 10.000 UFC	Crescimento bom a excelente de esporos pretos e contorno amarelado
Esterilidade	Ausência de crescimento

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 1ª 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