

CALDO BILE 2% VERDE BRILHANTE 4% / CALDO BILE 2% VERDE BRILHANTE 5%

FINALIDADE

Meio para pesquisa e confirmação de coliformes totais pelo método de NMP em alimentos, leite humano, água e outros materiais de importância sanitária.

APRESENTAÇÃO

Caldo Bile 2% Verde Brilhante 4% cx c/ 10 tubos – Cód. PA87
 Caldo Bile 2% Verde Brilhante 5% cx c/ 10 tubos – Cód. PA386

COMPOSIÇÃO

Formulação	g/L
Verde brilhante (4%)	39,9
Verde brilhante (5%)	50,0
Água purificada	1.000 mL

REGISTRO ANVISA

Cód. PA87 - 10287910059
 Cód. PA386 - ISENTO

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).

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.
 Verificar o prazo de validade na embalagem.
 Nunca utilizar produtos ressecados ou contaminados.
 Remover o produto da refrigeração até atingir a temperatura ambiente.

MATERIAIS E EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS COM O PRODUTO

- Alça bacteriológica;
- Micropipeta;
- Ponteiras estéreis;
- Estufa bacteriológica;
- Bico de Bunsen.

INFORMAÇÕES TÉCNICAS

- PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

O caldo Bile 2% Verde Brilhante 5% Newprov é utilizado para a detecção de coliformes totais, pelo método do Número Mais Provável (NMP) em alimentos, leite humano, água e outros materiais de importância sanitária, e também para confirmação de coliformes totais pela técnica de plaqueamento.
 O caldo Bile 2% Verde Brilhante 4% Newprov atende a técnica para confirmação de coliformes em leite humano.
 O meio contém inibidores para bactérias gram-positivas (bile) e para algumas bactérias gram-negativas (verde brilhante). Bactérias coliformes, que são resistentes à ação dos dois inibidores e fermentam lactose, são capazes de se reproduzirem no meio. A fermentação da lactose é detectada pela produção de gás.
 Quando doado, o leite humano é submetido a procedimentos de seleção, classificação e pasteurização. Após a pasteurização desse leite, dá-se início ao seu controle de qualidade através de uma metodologia alternativa, desenvolvida a partir do procedimento clássico para confirmação de coliformes totais. A metodologia consiste na inoculação de quatro alíquotas de 1 mL cada de leite humano ordenhado pasteurizado, pipetadas de forma independente e inseridas em tubos com 10 mL de caldo bile verde brilhante 5% com tubos de Durham em seu interior. Uma vez que o objetivo da pasteurização é eliminar 100% das bactérias patogênicas, a presença de coliformes em amostra de leite pasteurizado caracteriza o produto como impróprio para consumo.

- USUÁRIO PRETENDIDO

Profissionais de laboratório de pesquisa ou análise clínica que realizam estudos ou serviços em microbiologia. Profissionais do controle de qualidade em indústria alimentícia, farmacêutica e agropecuária.

- AMOSTRA

Amostras de água, alimentos e leite humano que necessitem confirmação de coliformes totais.

- TÉCNICA DE USO

Contagem de Coliformes Totais segundo o Método Clássico (NMP):

Teste presuntivo:

Três alíquotas de três diluições da amostra são inoculadas e uma série de três tubos de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST). Após 24 a 48 horas de incubação a 35°C os tubos que apresentarem crescimento com formação de gás são considerados positivos.

Teste Confirmatório:

Transferir 1 alçada de cada tubo de LST positivo para um tubo de Caldo Verde Brilhante 2% e outra para um tubo de Caldo EC. A prova é considerada positiva

para coliformes totais caso os tubos de BGBL apresentem crescimento com formação de gás após 24 a 48 horas de incubação a 35°C, e positiva para *E. coli* caso os tubos de caldo EC apresentem crescimento com formação de gás após incubação por 24 horas a 45,5°C (ou 44,5°C no caso de amostras de água).
 Obs: É recomendado que seja seguida a técnica padronizada em cada instituição.

Confirmação de colônias de coliformes totais pelo método do plaqueamento, segundo APHA:2015:

A confirmação é realizada em colônias que apresentem aspecto duvidoso nas placas VRB. Para estas, transferir uma alçada de cada colônia suspeita para tubos de BGBL (5% p/v), incubar a 36 ±1°C por 24 a 48 horas. Considerar como positivos para coliformes totais (confirmados) todos os tubos com crescimento e produção de gás, sem película superficial. Havendo formação de gás e película superficial, submeter um esfregão do caldo a Coloração de Gram e teste de oxidase. A visualização de bacilos gram-negativos, oxidase negativos, confirma a presença de coliformes totais.

Deteção de Coliformes Totais em Leite Humano:

Teste para Determinação de Coliformes:

A partir do procedimento clássico para detecção de coliformes totais, foi desenvolvida a metodologia alternativa que consiste na inoculação de quatro alíquotas de 1 mL cada de amostra de leite humano para tubos de BGBL (5% p/v). Após a incubação a 36 ±1°C por 24 a 48 horas, a presença de gás indica um resultado presumível, que deverá ser submetido ao teste confirmatório, obrigatoriamente.
 OBS: As alíquotas deverão ser coletadas em pontos diferentes do frasco.

Teste Confirmatório:

Os tubos considerados positivos de BGBL (5% p/v) devem ser confirmados transferindo 0,05 mL para tubos contendo BGBL (4% p/v). Após a incubação a 36 ±1°C, por 48 horas, a presença de gás confirma a presença de Coliformes Totais.

INTERFERENTES OU LIMITAÇÕES

Algumas situações poderão comprometer a execução dos testes e gerar interferências analíticas, como:

- Tempo longo entre a semeadura da amostra e análise. Ao utilizar colônias isoladas em um período superior a 24 horas, o metabolismo bacteriano pode ficar comprometido e a leitura de alguns parâmetros podem consequentemente ficar defasados ou até mesmo não ocorrer. Em colônias recentes (inferior ao período de 18 horas) não se encontram com o metabolismo bem definido, e algumas provas podem não ocorrer;
- Incubação em temperatura inadequada;
- Sobrecarga de inóculo ou falta de inóculo. Placas com uma carga bacteriana mais carregada podem fornecer resultados falsamente positivos e inóculos mais fracos fornecem resultados falsamente negativos;
- Interpretação equivocada de resultados;
- Técnica de assepsia inadequada;
- Tempo excessivo ou insuficiente de incubação. Tempo excessivo de incubação fornece resultados falsamente positivos e tempo insuficiente fornece resultados falsamente negativos;
- Utilização de material vencido, contaminado ou em condições inadequadas;
- Contaminação cruzada por uso de acessórios não esterilizados corretamente ou ambiente não asséptico;
- Utilização de meios de cultura com aparência alterada;
- Não aguardar para que os materiais atinjam a temperatura ambiente no momento do uso;
- Erro na conservação do produto pode ocasionar desidratação do meio e alteração das propriedades dos componentes.

REAÇÕES ADVERSAS

Não aplicável

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO DO PRODUTO

-ESPECIFICIDADE

Não aplicável

-LIMITE DE DETECÇÃO

100 UFC/mL

RISCOS RESIDUAIS

Não aplicável

INTERVALOS DE REFERÊNCIA

Não aplicável

REQUISITOS DE INSTALAÇÃO, TREINAMENTO OU QUALIFICAÇÕES ESPECIAIS

Não aplicável

LEITURA E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

O crescimento bacteriano no caldo BGBL é evidenciado pela turvação do meio, com produção de gás pela formação de bolhas de ar no tubo de Durham.

Contagem de coliformes totais pelo método NMP: Anotar o número de tubos de BGBL 2% com formação de gás, confirmatórios da presença de coliformes totais, e determinar o NMP/g ou mL em uma tabela de NMP adequada às diluições inoculadas.

Contagem de coliformes totais pelo método do plaqueamento direto: Considerar como positivos para coliforme total (confirmados) todos os tubos com crescimento e produção de gás, sem película superficial. Havendo formação de película superficial, fazer um esfregão do caldo e corar pelo

Gram: a visualização de bacilos gram-negativos confirma a presença de coliformes totais.

Detecção de Coliformes Totais em Leite Humano:

Considerar como positivos para coliformes totais (confirmados) todos os tubos com crescimento e produção de gás, e expressar os resultados como "ausência" ou "presença" de coliformes totais.

Aqueles frascos em que houve a formação de gás no teste confirmatório são considerados como resultado positivo final. Uma vez que o objetivo da pasteurização é eliminar 100% das bactérias patogênicas, a presença de coliforme em amostra de leite pasteurizado caracteriza o produto como impróprio para consumo. Os resultados serão expressos como ausência e presença de coliformes totais

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

Recomenda-se que seja realizado periodicamente o controle de qualidade utilizando as seguintes cepas:

ANÁLISES	RESULTADO ESPERADO
pH final a 25° C	7,4 ± 0,2
Aspecto final	Meio verde brilhante translúcido
Desempenho microbiológico <i>E. aerogenes</i> ATCC 13048 Inóculo ~ 1000 UFC	Crescimento bom a excelente com produção de gás
Desempenho microbiológico <i>E. coli</i> ATCC 25922 Inóculo ~ 1000 UFC	Crescimento bom a excelente com produção de gás
Desempenho microbiológico <i>S. aureus</i> ATCC 25923 Inóculo ~ 1000 UFC	Crescimento inibido
Desempenho microbiológico <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 Inóculo ~ 1000 UFC	Crescimento inibido
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 técnica-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.

Consulte sempre a instrução de uso através do QR code impresso no rótulo do produto para garantir a correlação adequada de versão/revisão do documento frente ao produto adquirido. Na necessidade de versão impressa da instrução de uso solicitar sem custo adicional (inclusive de envio) ao nosso SAC pelo (41) 38881300 ou sac@newprov.com.br

REFERÊNCIAS

1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 171, de 4 de setembro de 2006. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o Funcionamento de Bancos de Leite Humano. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 5 set. 2006.
2. BANCO DE LEITE HUMANO: funcionamento, prevenção e controle de riscos/ Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2008. BRASIL.
3. DIFCO & BBL MANUAL. Manual of Microbiological Culture Media. Maryland: Becton, Dickinson and Company, 2003.
4. FIOCRUZ (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ). Programa Nacional de Qualidade em Bancos de Leite Humano. Rio de Janeiro, 2003.
5. ISO 7251. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection and enumeration of presumptive *Escherichia coli* —

Most probable number technique. 3 ed. The International Organization for Standardization, 2005.

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

7. Ministério da Saúde. Recomendações técnicas para o funcionamento de bancos de leite humano. 4. ed. Brasília, 2001. 48 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos, n. 117).

8. NOVAK, F. R.; ALMEIDA, J. A. G. Teste alternativo para a detecção de coliformes em leite humano ordenhado. Jornal de Pediatria, Rio de Janeiro, v. 78, n. 3, p. 587-591, maio/ jun. 2002.

9. SILVA, de Neusely; et al. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água, 5ª ed. São Paulo: Blucher, 2017.

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