Procedimento (quantitativo)

- Homogeneizar amostra, invertendo o frasco 25 vezes, em arco de 30 cm;
- inocular 100 mL de amostra em frasco estéril;
- abrir com assepsia o tubo contendo o meio de cultura, adicionar ao frasco com a amostra e agitar para homogeneizar a mistura amostra/reagente;
- transferir assepticamente 20 ml para 5 tubos de ensaio estéreis não fluorescentes ou 10 ml para 10 tubos de ensaio estéril não fluorescente, incubar os tubos contendo a amostra em estufa, deixando-o em residência por no máximo 24 horas a 35ºC +ou- 0,5ºC (a partir de 18 horas a leitura já poderá ser feita se houver positividade);
- retirar da estufa e observar se houve mudança na coloração para amarelo, se positivo submeter à exposição de luz UV (em câmara) para verificar a presença ou não de fluorescência azul esverdeada;
- os frascos positivos não devem ficar na geladeira (para evitar resultados discordantes) até a verificação da necessidade de identificação;

Cálculos e expressão dos resultados

OBS: Mudança de cor para amarelo (conforme comparador de cor***) é considerada positiva para coliformes totais e se houver fluorescência confirmará presença de ***Escherichia coli***;

***não acompanha o KIT

- Sem desenvolvimento de cor indica ausência de Coliformes Totais e Escherichia coli.
- Desenvolvimento de coloração amarela sem fluorescência indica presença de Coliformes Totais. Proceder à contagem dos tubos e utilizar as tabelas ao lado para determinação do NMP (Tabela I ou II).
- Desenvolvimento de coloração amarela com fluorescência observada em luz ultravioleta indica a presença de ***Escherichia coli***. Proceder à contagem dos tubos e utilizar a tabela abaixo para determinação do NMP (Tabela I ou II).

Anexo I

Determinação do NMP (Número mais provável)

Tabela I - Número mais provável

Número de tubos positivos (com gás) 5 de 20 mL	NMP/ 100 mL
0	<1,1
1	1,1
2	2,6
3	4,6
4	8,0
5	>8,0

Fonte: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater- Tabela 9221.II- Pag. 9-48

Tabelall - Número mais provável

Nºde tubos Positivos (com gás) 10 de 10 mL	NMP P/100 mL	Limite de confiança Baixo	Alto
0	<1,1	0	3,0
1	1,1	0,03	5,9
2	2,2	0,26	8,1
3	3,6	0,69	10,6
4	5,1	1,3	13,4
5	6,9	2,1	16,8
6	9,2	3,1	21,1
7	12,0	4,3	27,1
8	16,1	5,9	36,8
9	23,0	8,1	59,5
10	>23,0	13,5	infinito

Fonte: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater- Tabela 9221.III- Pag. 9-48

Referência bibliográfica

- American Public Health Association - Standard Methods for the water of wastewater- Method 9223-B- Chromogenic Substrate Test -. 20 ed. New York, APHA, AWWA, WPCP, 2000.
- Difco Manual, 11th edition, 1998.

Manual AquatestColi

Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda
CNPJ 76.619.113/0001-31
Insc. Estadual 1370012926
Rua: Casimiro de Abreu, 521
Pinhais/PR CEP 83.321-210
Telefone: (41) 3661-9000
Serviço de Assessoria ao Cliente
SAC 0800-0410027
sac@laborclin.com.br

Instruções Aquateste Coli

Coliformes totais e fecais em águas

Este grupo é composto por bactérias da família das Enterobacteriaceae, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, quando incubadas a 35-37ºC, por 48 horas. São bacilos Gram-negativos não formadores de esporos. Fazem parte deste grupo: ***Escherichia, Enterobacter, Citrobacter*** e ***klebsiella***. Apenas a Escherichia coli tem como habitat primário o trato intestinal do homem e animais de sangue quente. Os demais além de serem encontrados nas fezes, também estão presentes no solo e em vegetais onde persistem por tempo superior aos de bactérias patogênicas de origem intestinal como ***Salmonella*** e ***Shigella***.

A especificação do meio e da temperatura são críticos para a interpretação dos resultados. Com base nas evidencias 20 ou mais espécies representativas atendem aos critérios que definem o grupo coliforme. O mesmo não identifica os membros individualmente, tem menor valor interpretativo que o único organismo índice a ***Escherichia coli***, bem como o grupo de origem fecal, pois o grupo pode conter outros membros não entéricos como o gênero ***Serratia*** e ***Aeromonas***. A presença de coliformes totais no alimento não indica necessariamente contaminação fecal recente ou ocorrência de enteropatógenos.

As enterobactérias ONPG positivas, porém não fermentadoras de lactose apresentam crescimento tardio e não devem ser considerados.

Princípio do método

O Aquateste coli é um meio de cultura apresentado em frascos estéreis em quantidades individuais para uma amostra, contendo sais, fontes de carbono e nitrogênio, indicadores e nutrientes selecionados para detecção simultânea de coliformes totais e ***Escherichia coli***. Na composição a presença do orto-nitrofenil beta-D galactopiranosídeo (ONPG) que diferenciam os organismos que apresentam as enzimas de fermentação de lactose (beta-galactosidase) e 4- metillumbeliferil-beta-D glicuronídeo (MUG), para diferenciar ***Escherichia coli***, que apresenta a enzima Beta-glicuronidase. O meio possui inibidores de crescimento para ***Pseudomonas*** e ***Aeromonas***.

A ***Shigella*** também metaboliza o MUG pela presença da enzima ß-glucuronidase, porém esta não cresce no meio pelo baixo teor de substancias nutrientes.

Amostras coliformes positivas são detectadas visualmente por desenvolvimento de cor amarela no meio de cultura, e a presença de ***Escherichia coli*** detectada pela observação de fluorescência azul esverdeada submetida à exposição de luz UV (365-366 nm).

Importância

O grupo coliforme é considerado um indicador de contaminação fecal da água, assim, sua detecção na amostra permite considerar esta como imprópria para consumo humano. O presente teste permite detectar a presença de coliformes em 24h.

Aplicação

Águas da rede pública, água mineral, água de poço, água de fonte, água de rio e outras águas potáveis.

Amostragem

Proceder à amostragem de 100 ml de amostra em recipiente estéril de acordo com o tipo de amostra a ser coletada:

- *Água clorada: acrescentar 0,1 ml de solução de Tiossulfato de Sódio a 10% ;
- *Água "in natura" – acrescentar 0,1 ml de solução de EDTA 15%.

*OBS: Volumes acima de 100 ml de amostra adicionar a quantidade das soluções acima proporcionalmente ao volume coletado.

- Identificar a amostra preenchendo a etiqueta de identificação do frasco ou que forneça as informações necessárias.
- Enviar a amostra ao Laboratório acondicionada em caixa térmica (isopor ou similar) mantendo-a refrigerada em temperaturas < 10 °C (ex. gelo**) no máximo 24 horas da coleta (ideal 8 a 12 horas).
- Lavar bem as mãos antes de proceder à coleta.

**OBS.: Acondicionar o gelo em embalagem íntegra (saco plástico), evitando contato direto deste com a amostra.

Água de rede/ água de fonte com torneira/ poço com bomba

Não coletar água de torneira que passem por aeradores, filtros ou que apresentem vazamentos.

Procedimento

- Com a torneira completamente aberta, deixar a água escoar por 2-3 min;
- fechar a torneira limpar a mesma com álcool, se possível flambar (torneiras metálicas);
- abrir a torneira deixando apenas um filete de água escoando (baixa vazão);
- remover rapidamente, a tampa do frasco coletor, tomando o cuidado para não tocar no bocal do frasco e não deixar a tampa tocar em qualquer superfície, para evitar contaminação cruzada;
- aproximar o frasco da torneira verticalmente, e enchê-lo com a amostra até ¾ de sua capacidade;
- imediatamente após este procedimento fechar o frasco.

Poço sem bomba

Não coletar a amostra com balde que é rotineiramente utilizado para retirar água do poço.

Procedimento

- Coletar a amostra com cuidados de assepsia, evitando qualquer contato com a parte interna do gargalo e tampa do frasco, não permitindo que a parte interna da tampa repouse no solo ou em qualquer outra superfície capaz de contaminar a mesma;
- amarrar ao gargalo do frasco um chumbinho (daqueles utilizados em vara de pesca), com um barbante limpo ou fio de nylon preferivelmente;
- retirar a tampa, descer o frasco cuidadosamente, evitando tocar as paredes do poço;
- quando atingir a superfície da água , fazer movimentos leves e deixar o mesmo encher (percebe-se pelo peso);
- retirar o frasco do poço, desprezar uma pequena porção da amostra, deixando cerca de ¾ do volume do frasco;
- imediatamente após chegar à superfície do poço tampar e não abrir mais até o momento da análise.

Água de fonte (bica)

Procedimento

- Remover, rapidamente, a tampa do frasco coletor, tomando o cuidado de não tocar no bocal do frasco e não deixar a tampa tocar em qualquer superfície, para evitar contaminação cruzada;
- segurar o frasco, verticalmente, e enchê-lo com a amostra até ¾ de sua capacidade;
- fechar o frasco, imediatamente, após a amostragem.

Águas superficiais (rios, lagos, piscinas, reservatórios)

- Evitar coletar amostras muito próximas às margens e em áreas estagnadas.

Procedimento

- Remover, rapidamente, a tampa do frasco coletor, tomando o cuidado de não tocar no bocal do frasco e não deixar a tampa tocar em qualquer superfície, para evitar contaminação.
- Segurar o frasco pela base, com uma das mãos, e mergulhá-lo rapidamente, com a boca para baixo, a cerca de 20 cm abaixo da superfície da água, evitando a introdução de contaminantes superficiais.
- Com a boca do frasco em sentido contrário à corrente, inclinar lentamente este com angulação de + ou -? 15º, permitindo a saída do ar interno e consequentemente o enchimento do mesmo. Quando não houver corrente, movimentar o frasco para frente na direção horizontal.
- Retirar o frasco do corpo d'água, desprezar uma pequena porção da amostra, deixando cerca de ¾ do volume do frasco.
- Fechar o frasco, imediatamente, após a coleta.

Critérios de rejeição

Rejeitar as amostras que forem coletadas em frascos impróprios ou que não estiverem devidamente identificadas (ponto, horário da coleta etc.).

Precauções e cuidados especiais

Amostras suspeitas de alto grau de contaminação devem ser diluídas, 1:2 até 1:1.000 com água destilada estéril.

Armazenamento e estabilidade

As amostras devem ser coletadas em recipientes estéreis e inoculadas o mais rapidamente possível. Do contrário, manter em geladeira (2-8 C) por até 24h.

Limitações do método

As limitações da presente metodologia estão principalmente ligadas a fatores de amostra, devendo ser observados os cuidados preconizados para amostras cloradas e de fontes contaminadas.

Controle da qualidade

- Materiais necessários

Recomenda-se inocular 3 bactérias controle, sendo sugeridas: ***Escherichia coli*** (ATCC 25922 ou 11775), expectativa de resultado amarelo e fluorescência; um coliforme total (p.ex. ***Klebsiella pneumoniae*** ou o ***Enterobacter cloacae***) amarelo sem fluorescência e um não coliforme (p.ex. - ***Pseudomonas aeruginosa*** ATCC 10145 ou 27853 ou ***Aeromonas sp***) incolor.

- Periodicidade

Testar a cada novo lote recebido ou em periodicidade estabelecida pelo próprio laboratório.

Análise dos resultados

Resultados anormais (diferentes dos esperados) implicam em uma análisea profundada das causas e na impossibilidade de se validar resultados antes de seu esclarecimento.

Garantia da qualidade

A Laborclin obedece ao disposto na Lei 8.078/90 - Código de Defesa do Consumidor. Para que o produto apresente seu melhor desempenho, é necessário :

- que o usuário conheça e siga rigorosamente o presente procedimento técnico;
- que os materiais estejam sendo armazenados nas condições indicadas;
- que os equipamentos e demais acessórios necessários estejam em boas condições de uso , manutenção e limpeza.

Antes de ser liberado para venda, cada lote do produto é submetido a testes específicos, que são repetidos periodicamente até a data de vencimento expressa em rótulo. Os certificados de análise de cada lote podem ser solicitados junto ao SAC - Serviço de Assessoria ao Cliente, bem como em caso de dúvidas ou quaisquer problemas de origem técnica, através do telefone 0800-410027. Quaisquer problemas que inviabilizem uma boa resposta do produto, que tenham ocorrido comprovadamente por falha da Laborclin serão resolvidos sem ônus ao cliente, conforme o disposto em lei.

PROCEDIMENTO ANALÍTICO PRESENÇA/AUSÊNCIA

- Homogeneizar amostra, invertendo o frasco 25 vezes, em arco de 30 cm;
- inocular 100 mL de amostra em frasco estéril não fluorescente;
- abrir com assepsia o frasco contendo o meio de cultura, adicionar ao frasco contendo a amostra e agitar vigorosamente para homogeneizar a mistura amostra/reagente;
- incubar o frasco contendo a mistura em estufa,deixando-o em residência por no máximo 24 horas a 35ºC (?0,5ºC) (a partir de 18 horas a leitura já poderá ser feita se houver positividade);
- retirar da estufa e observar se houve mudança na coloração para amarelo, se positivo submeter à exposição de luz UV (em câmara) para verificar a presença ou não de fluorescência azul;
- os frascos positivos de P/A não devem ficar na geladeira (para evitar resultados discordantes) até a verificação da necessidade de identificação;
- quando acusar resultado positivo para coliformes totais e ***Eschericha coli*** utilizar o método do número mais provável (NMP) para contagem das colônias.

Expressão dos resultados

- Este ensaio não requer cálculos à observação é visual.
- Qualquer mudança de cor para amarelo é considerada positiva para coliformes totais e se houver fluorescência confirmará presença de ***Escherichia coli***
- Sem desenvolvimento de cor indica ausência de Coliformes Totais e ***Escherichia coli***.
- Desenvolvimento de coloração amarela sem fluorescência indica presença de Coliformes Totais.
- Desenvolvimento de coloração amarela com fluorescência observada em luz ultravioleta indica a presença de ***Escherichia coli***.