

TRIPLACA XLD / VERDE BRILHANTE / SALMONELLA CROMOGÊNICO



Finalidade:

Meios seletivos e diferenciais para isolamento de *Salmonella* spp.

Registro ANVISA:

10097010167

Apresentação:

540183 - TRIPLACA-XLD/VER.BRI/SALM.CR.-3X8mL-10PL

LB 172178
Rev 06 – 08/2024

1. INTRODUÇÃO

As Salmonelas são bactérias Gram negativas, em forma de bacilo, na sua maioria móvel (com flagelos peritíquios), não esporulada, não capsulada, sendo que a maioria não fermenta a lactose. Fermentam arabinose, maltose, manitol, manose, ramnose, sorbitol. A *Salmonella* é um dos principais agentes patogênicos na produção de gastroenterites provocadas pelos alimentos. Por isso, foram desenvolvidos muitos meios diferentes para o isolamento a partir de alimentos e outras amostras.

Segundo a ISO 6579-1:2017, a partir das culturas de enriquecimento inoculam-se dois meios de isolamento seletivos. O primeiro ágar de isolamento utilizado é o XLD e o segundo é escolhido pelo laboratório, desde que seja complementar ao ágar XLD, ou seja, obtenha colônias com diferentes características das obtidas no ágar XLD, para facilitar a detecção, por exemplo, *Salmonella* lactose positiva ou H_2S negativa. Sendo sugerido como um dos meios de escolha o Ágar salmonella cromogênico ou Ágar Verde Brilhante.

A triplaca fornece 3 meios de cultura que facilitam o crescimento simultâneo de bactérias do gênero *Salmonella* spp:

O Ágar XLD (ágar de desoxicolato-lisina-xílose) é um meio moderadamente seletivo para diferenciação destinado ao isolamento de *Salmonella* e *Shigella*.

O ágar verde brilhante é um meio altamente seletivo, usado para o isolamento de outras Salmonellas que não as *S. typhi* e *S. paratyphi*.

O ágar Salmonella cromogênico é um meio seletivo para diferenciação, utilizado no isolamento e identificação presuntiva das espécies de *Salmonella*, sua proposta é a identificação presuntiva do gênero através do uso de cromogênicos específicos agregados a formulação do meio.

2. COMPOSIÇÃO

Ágar XLD

Formulação	Concentração/L
Xílose	3,5g
L-Lisina	5,0
Desoxicolato de sódio	1,0g
Sacarose	7,5g
Lactose	7,5g
Nutriente	3,0g
Vermelho de Fenol	0,08g
Cloreto de sódio	5,0g
Tiosulfato de sódio	6,8g
Citrato Férrico amoniacal	0,8g
Agar	12,5 g
Água	1 L
pH 7,4± 0,2 a 25°C	

Ágar Verde Brilhante

Formulação	Concentração/L
Extrato de Carne	3,0g
Peptona	10,0g

Extrato de Levedura	3,0g
Cloreto de sódio	5,0g
Lactose	10,0g
Sacarose	10,0g
Vermelho de Fenol	0,08g
Verde Brilhante	12,5mg
Ágar	20,0g
Água	1 L
pH 6,9± 0,2 a 25°C	

Samonella Cromogênico

Formulação	Concentração/L
Cromopeptona	22,0g
Mistura cromogênica	0,34g
Inibidores	8mg
Ágar	15,0 g
pH 7,6± 0,2 a 25°C	

A fórmula pode ser ajustada e/ou suplementada, conforme necessário, para cumprir os critérios de desempenho.

3. AMOSTRAS

a- Tipos de amostras

- As amostras devem ser enriquecidas seletivamente em meio apropriado (Caldo Tetratônato, Rappaport, Muller Kauffmann ou Selenito) antes de sua inoculação na triplaca. O usuário deve estabelecer os critérios de conservação, armazenamento e rejeição para cada material específico.
- O laboratório deve estabelecer critérios de coleta, rejeição e conservação das amostras, conforme sua política da qualidade.
- Sempre considerar as necessidades específicas dos microrganismos alvos das análises, microrganismos com necessidades especiais (suplementos específicos ou ambiente controlados) podem não apresentar crescimento adequado se semeados em meio de cultura que não apresente os requisitos mínimos.

4. INFORMAÇÕES GERAIS DO PRODUTO

a- Armazenamento e estabilidade

Para fins de transporte, o produto pode permanecer em temperatura ambiente por até 72h. No laboratório as placas devem ser armazenadas em temperatura de 2 a 12°C, condições em que se mantém estáveis até a data de vencimento expressa em rótulo, desde que isento de contaminação de qualquer natureza. O uso de refrigerador tipo *frost-free* não é recomendado para meios de cultura devido ao efeito desidratante deste tipo de equipamento.

Considerando que este produto é gelatinoso e sua composição pode apresentar até 80% de água, ao sofrer variações de temperatura (quente-frio ou frio-quente) todo meio de cultura pode gerar condensação, de pouca a muita, acumulando água na placa. Recomenda-se guardar as placas com os meios de cultura virados para cima e, quando necessário, desprezar a água acumulada e

deixar o meio de cultura estabilizar a temperatura antes de sua utilização.

Conforme descrito em literatura, o laboratório deve retirar da refrigeração apenas a quantidade de produto que deverá ser utilizada em sua rotina e deixar estabilizar a temperatura, ou secar a água condensada, antes de sua utilização, em temperatura ambiente, podendo utilizar a incubação em estufa ($\pm 35^{\circ}\text{C}$) para redução do tempo de secagem ou estabilização. A repetição do processo de refrigeração/estabilização não é recomendada, a constante troca de temperatura pode levar a desidratação do meio, expor o produto a contaminações ou gerar um acúmulo de água excessiva.

A água acumulada por condensação, ocasionada por alguma variação de temperatura, não influencia no desempenho do produto, desde que este não apresente ressecamento ou diminuição de espessura.

Devido a presença de substratos sensíveis, recomenda-se manter o produto protegido de incidência direta de luz (natural ou artificial) e evitar grandes variações de temperatura até a utilização.

b- Precauções e cuidados especiais

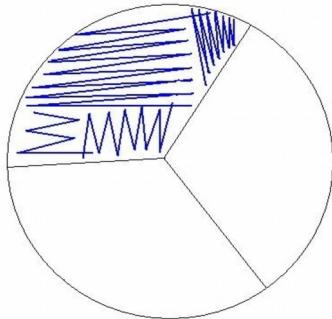
- O produto é destinado apenas para o uso *in vitro*;
- Uso restrito por profissionais;
- Mesmo se tratando de produto livre de agentes infecciosos, recomenda-se tratar este produto como potencialmente infeccioso, observando o uso de equipamentos de proteção individual e coletivo;
- Não inalar ou ingerir;
- Não utilizar placas com sinais de contaminação, ressecamento ou com alterações de cor ou espessura;
- Não usar materiais com o prazo de validade expirado, ou que apresentem selo de qualidade rompido ou violado;
- Recomenda-se a leitura da diretriz aprovada para "Proteção de Trabalhadores de Laboratório e Infecções Obtidas no Trabalho - CLSI® M29-A" para o manuseio seguro;
- Para acondicionamento e descarte do material usado, autoclavar a 121°C por 20 minutos. Recomendamos o uso dos sacos Detrilab;
- Os procedimentos de manuseio referentes ao processamento e manuseio para o descarte deverá estar de acordo com a RDC 222, DE 28 DE MARÇO DE 2018 que dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde.

5. MATERIAL NECESSÁRIO (porém não fornecido)

- Estufa bacteriológica;
- Bico de Bunsen;
- Alças bacteriológicas.

6. PROCEDIMENTO TÉCNICO

- a- Retirar o pacote de placas da geladeira e separar as placas a serem usadas, retornando o pacote à geladeira;
- b- Colocar as placas em estufa bacteriológica entre $35\text{--}37^{\circ}\text{C}$ pelo tempo necessário para adquirirem esta temperatura;
- c- Semear o material de acordo com técnicas estabelecidas pelo laboratório ou conforme imagem abaixo:



- d- Incubar por período exigido pela técnica adotada.
- e- Realizar leitura.

7. RESULTADOS

- a- Havendo crescimento, analisar o desenvolvimento de cor no meio, verificando:

No XLD: As bactérias que produzem H_2S apresentam precipitado negro na colônia. Bactérias que hidrolisam a lisina (como as Salmonellas) alcalinizam o meio, tornando-se transparentes ou avermelhadas (com centro negro se produtoras de H_2S). A presença de lactose e sacarose no meio facilita o crescimento de bactérias que fermentam estes açúcares (acidificação do meio formando colônias amarelas ou avermelhadas).

No Verde Brilhante: Samonella que não *S. typhi* e *S. paratyphi* apresentam colônias brancas a vermelhas, opacas, cercadas por um halo avermelhado. *S. typhi* e *S. paratyphi* não apresentam crescimento neste meio.

No Salmonella Cromogênico: Presença de colônias de coloração magenta caracterizam o crescimento de Salmonella.

b- Após isolamento das colônias típicas, realizar a confirmação com provas bioquímicas conforme metodologia estabelecida pelo laboratório.

8. LIMITAÇÕES DO MÉTODO

(Riscos Residuais Identificados conforme RDC 830/2023)

Os resultados falsamente positivos ou negativos podem ocorrer, com maior frequência, nas seguintes situações:

- 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.
- Exposição e incubação da placa a temperaturas elevadas. Os substratos cromogênicos podem ser decompuestos e/ou inativados.
- 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
- A triplaca fornece identificação presuntiva para Salmonella. A identificação definitiva das espécies bacterianas isoladas deverá ser efetivada com o uso de sistemas mais sensíveis como o sistema Bactrav. Para tanto, as colônias devem estar bem isoladas.

9. CONTROLE DE QUALIDADE

- *Materiais necessários*

Cepas padrão: ATCC® (American Type Culture Collection) ou derivadas).

- *Controle de qualidade recomendado:*

Parâmetro	Resultado esperado	
Produtividade qualitativa – <i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	Crescimento bom - Colônias magentas	Incubação 33-37°C/ 24h-Ágar Salmonella cromogênico
Seletividade qualitativa – <i>E. coli</i> ATCC 25922	Inibição total a parcial - Colônias Azuis	Incubação 33-37°C/ 24h-Ágar Salmonella cromogênico
Seletividade qualitativa – <i>P. mirabilis</i> ATCC 25933	Inibição total a parcial	Incubação 33-37°C/ 24h-Ágar Salmonella cromogênico
Produtividade qualitativa - <i>S. typhimurium</i>	Crescimento bom - Colônias incolores ou ligeiramente róseas	Incubação 33-37°C/ 24h-Ágar Verde Brilhante

ATCC 14028		
Produtividade qualitativa - <i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	Crescimento bom - Colônias com centro negro e uma zona levemente transparente de cor avermelhada	Incubação 33-37°C/ 18h - Agar XLD
Teste de Esterilidade	Sem crescimento	Incubação 35°C / 48h
Meio não inoculado	XLD - Meio sólido levemente opaco, com coloração rósea a avermelhada, livre de precipitados ou partículas visíveis.	
Meio não inoculado	Verde Brilhante - Meio sólido levemente opaco, cor marrom alaranjada, livre de precipitados ou partículas visíveis.	
	Salmonella cromogênico - Meio de coloração âmbar claro, ligeiramente opalescente, com pequeníssimos precipitados.	

- Periodicidade

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

- Análise dos resultados

As cepas inoculadas no material devem apresentar características de crescimento esperados. Caso se constate algum problema ou diferença, os resultados das amostras não devem ser liberados até que as causas tenham sido apuradas devidamente e os problemas constatados sanados.

10. 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;
- Os materiais estejam sendo armazenados em condições adequadas;
- 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 obtidos junto ao site www.laborclin.com.br. Em caso de dúvidas ou outras informações, contatar o SAC - Serviço de Assessoria ao Cliente através do telefone 0800-0410027 ou pelo e-mail sac@laborclin.com.br. 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.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Difco Manual, 2th edition 2009.
2. ISO 11133. Microbiology of food, animal feed and water
- Preparation, production, storage and performance testing of culture media. 1rd ed. The International Organization for Standardization, 2014.
3. ISO 6579-1. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella*
- Part 1: Detection of *Salmonella* spp. 1th ed. The International Organization for Standardization, 2017.
4. SILVA, de Neusely; *et al.* Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água, 5^a ed. São Paulo: Blucher, 2017.

***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

www.laborclin.com.br

Responsável Técnico:

Maire Wakamori – CRF/PR-20176

Serviço de Assessoria ao Cliente

SAC 0800-0410027

sac@laborclin.com.br

ANEXO 1 – LISTA DE SÍMBOLOS UTILIZADOS NOS RÓTULOS

REF	Código do produto	LOT	Número de lote
SN	Número de série		Fabricante
	Consultar instruções para utilização		Validade
	Temperatura de armazenagem (limite de temperatura)	IVD	Produto para saúde para diagnóstico <i>in vitro</i> .
	Não utilizar se a embalagem estiver danificada	EC REP	Representante autorizado na Comunidade Europeia
	Quantidade suficiente para <n> ensaios		Frágil, manusear com cuidado
STERILE A	Esterilizado utilizando técnicas assépticas de processamento	STERILE EO	Esterilização utilizando óxido de etileno
STERILE R	Esterilização utilizando irradiação	STERILE I	Esterilizado utilizando vapor ou calor seco.
	Risco biológico		Cuidado. Importante consultar instruções de uso.
CONTROL	Controle	CONTROL -	Controle Negativo
CONTROL +	Controle Positivo		Manter seco
	Manter afastado da luz solar e longe do calor		Somente para avaliação de desempenho
	Não utilizar		Não reesterilizar

Fonte: ABNT NBR ISO 15223-1 – Terceira edição (24.08.2022)