

**Finalidade:**

Meio de cultura estéril para cultivo e contagem de Enterobactérias, Gram negativa Bile tolerantes.

**ANVISA nº MS:**

10097010149

**Apresentação:**

540163 - VIOLET RED BILE-AGAR-GLI-20mL-90X15-10PL

LB 172221  
Rev. 05 – 09/2024

**1. INTRODUÇÃO**

Enterobactérias é como se chamam os membros da família **Enterobacteriaceae**, que inclui as bactérias Gram negativas na forma de bastonetes retos, não esporogênicas, anaeróbias facultativas e oxidase negativa. São quimiorganotróficas com metabolismo respiratório e fermentativo, a maioria produzindo ácidos e gás na fermentação da glicose e outros carboidratos.

As enterobactérias são amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas no solo, água, plantas, frutas, vegetais, carnes, ovos, grãos, animais, insetos e no homem. As enterobactérias são utilizadas como indicadores das condições de higiene dos processos de fabricação, porque são facilmente inativadas pelos sanitizantes e capazes de colonizar vários nichos das plantas de processamento, quando a sanitização é falha.

A quantificação de enterobactérias é feita pelo método de contagem padrão em placas, utilizando o Ágar Vermelho Violeta Bile Glicose (VRBG) como meio de cultivo. O VRBG é um meio seletivo diferencial contendo cristal violeta e sais biliares, que inibem bactérias Gram positivas. A fermentação da glicose resulta em ácidos, detectados pelo indicador de pH vermelho neutro (viragem para vermelho) e pela formação de uma zona de precipitação de sais biliares em torno das colônias.

**2. COMPOSIÇÃO**

| Formulação                      | Concentração/L |
|---------------------------------|----------------|
| Extrato de levedura             | 3,0g           |
| Digesto pancreático de gelatina | 7,0g           |
| Sais Biliares                   | 1,5g           |
| Glicose                         | 10,0g          |
| Cloreto de Sódio                | 5,0g           |
| Vermelho Neutro                 | 0,03g          |
| Cristal de Violeta              | 2,0mg          |
| Agar                            | 15,0 g         |
| Água                            | 1 L            |
| pH 7,4± 0,2 a 25°C              |                |

A formulação pode ser ajustada e/ou suplementada conforme necessário para cumprir os critérios do desempenho do produto.

**3. AMOSTRA****a) Tipos de amostras**

- Vários tipos de amostra podem ser inoculadas no ágar Vermelho Violeta Bile Glicose.
- 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 SOBRE O 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 8°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 (30-35°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 excessivo.

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 à 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 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 Dextrilab.
- 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. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS (porém não fornecidos)**

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

**6. PROCEDIMENTO TÉCNICO****6.1 Meio em placas 90x15**

- a- Colocar as placas em estufa bacteriológica pelo tempo necessário para adquirirem a temperatura;  
b- Espalhar a amostra sobre a superfície da placa conforme técnica adequada;  
c- Incubar o material em estufa bacteriológica entre 30-35°C por 24-48h;  
d- Seguir a técnica de contagem e identificação conforme critério adotado pelo laboratório.

#### 6.2 Meio em placas RODAC

- a- Com a placa em temperatura ambiente, encostar a superfície do meio de cultura na superfície a monitorar, fazendo uma leve pressão com os dedos no meio da placa, durante 10 segundos;  
b- Incubar o material em estufa bacteriológica entre 30-35°C por 24-48h;  
c- Seguir a técnica de contagem e identificação conforme critério adotado pelo laboratório.

### 7. RESULTADOS

Havendo crescimento de colônias vermelhas/pink de 1-2mm de diâmetro, com halo de precipitado rosado, indica a presença de enterobactérias.

#### 7.1 Cálculo para placas 90x15

- a- Contagem de enterobactérias UFC/g ou UFC/mL  
b- Multiplicar o número de colônias por 10 e pelo inverso da diluição.

Nota: ou seguir contagem e expressão de resultados conforme critério adotado pelo laboratório.

#### 7.1 Cálculo para placas RODAC

- a- Contar o número de colônias desenvolvidas;  
b- Calcular o número de microrganismos viáveis m<sup>2</sup>, considerando o número de colônias, área da placa.  
c- Área da placa rodac = 25cm<sup>2</sup>.  
d- Nº de microrganismos viáveis = nº colônias/25x10

### 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 sementeira 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.
- Utilização de agulha flambada não resfriada.
- Sobrecarga de inóculo ou falta de inóculo. Placas com inóculos mais carregados podem gerar resultados falsamente positivos e inóculos em menor quantidade podem fornecer 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

### 9. CONTROLE DA QUALIDADE

- *Materiais necessários*

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

- Controle de qualidade recomendado:  
Cód. 540163

|                                                         |                                                                                                 |                       |
|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Crescimento presuntivo – <i>E. coli</i> ATCC 8739       | Crescimento de colônias vermelhas com precipitado                                               | Incubação 30-35°C 18h |
| Crescimento presuntivo – <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 | Crescimento de colônias róseas                                                                  | Incubação 30-35°C 18h |
| Propriedade inibitória – <i>S. aureus</i> ATCC 6538     | Inibição total                                                                                  | Incubação 30-35°C 18h |
| Meio não inoculado                                      | Meio sólido, vermelho púrpura, pouco opalescente, livre de precipitados ou partículas visíveis. |                       |

#### - Periodicidade

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

#### - Análise dos resultados

O meio Violet Red Bile Agar testado com cepas padrão deve expressar os resultados esperados. Caso se constata algum problema, os resultados 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 nas condições indicadas;
  - 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 conforme calendário estabelecido pela empresa até a data de vencimento expressa em rótulo. Os certificados de análise de cada lote podem ser obtidos no site [www.laborclin.com.br](http://www.laborclin.com.br). Em caso de dúvidas ou quaisquer problemas de origem técnica, entrar em contato com o SAC - Serviço de Assessoria ao Cliente através do telefone 0800-0410027 ou pelo e-mail [sac@laborclin.com.br](mailto: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

1. APHA: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 5th ed. American Public Health Association, Washington, D.C., 2015.
2. Brasil. Farmacopeia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010.
3. Difco Manual, edition 2009.
4. ISO 11133. Microbiology of food, animal feed and water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media. 1<sup>st</sup> ed. The International Organization for Standardization, 2014.
5. SILVA, de Neusely; *et al.* Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água, 5ª ed. São Paulo: Blucher, 2017.
6. The United States Pharmacopeia. Rockville: United States Pharmacopeial Convention. 35 ed. 2012.



#### 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](http://www.laborclin.com.br)

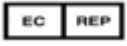
#### Responsável Técnico:

Maire Wakamori – CRF/PR-20176  
Serviço de Assessoria ao Cliente  
SAC 0800-0410027  
[sac@laborclin.com.br](mailto:sac@laborclin.com.br)

Parâmetros

Resultado esperado

## ANEXO 1 – LISTA DE SÍMBOLOS UTILIZADOS NOS RÓTULOS

|                                                                                     |                                                              |                                                                                     |                                                       |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|    | Código do produto                                            |    | Número de lote                                        |
|    | Número de série                                              |    | Fabricante                                            |
|    | Consultar instruções para utilização                         |    | Validade                                              |
|    | Temperatura de armazenagem<br>(limite de temperatura)        |    | Produto para saúde para diagnóstico <i>in vitro</i> . |
|    | Não utilizar se a embalagem estiver danificada               |    | Representante autorizado na Comunidade Européia       |
|    | Quantidade suficiente para <n> ensaios                       |    | Frágil, manusear com cuidado                          |
|  | Esterilizado utilizando técnicas assépticas de processamento |  | Esterilização utilizando óxido de etileno             |
|  | Esterilização utilizando irradiação                          |  | Esterilizado utilizando vapor ou calor seco.          |
|  | Risco biológico                                              |  | Cuidado. Importante consultar instruções de uso.      |
|  | Controle                                                     |  | Controle Negativo                                     |
|  | 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)