

Finalidade:

Meio de cultura estéril para cultivo e contagem de heterotróficas em água, através da técnica de membrana filtrante ou sementeira em superfície.

Registro ANVISA:

Não aplicável

Apresentação:

540166 - R2A-AGAR-HETEROTROF.-20mL-PL90X15-PC10PL

LB 172223
Rev 04 – 09/2024

1. INTRODUÇÃO

O R2A ágar foi desenvolvido por Reasoner e Geldreich para enumeração e cultivo de bactérias em água tratada. Este meio é recomendado para contagem de heterotróficas pelo método de plaqueamento em superfície (Spread plate) e membrana filtrante.

O plaqueamento em superfície (Spread plate) é considerado vantajoso, pois não expõe os microrganismos ao calor do meio fundido, permite a visualização de características morfológicas e diferenciais de colônias.

O método da filtração em membrana tem as vantagens de ser mais simples de executar, não exigindo a confirmação e permitindo uma contagem direta de heterotróficas. O procedimento de filtração em membrana é limitado à análise de amostras líquidas límpidas, sem sólidos em suspensão, que possam ser filtradas através de uma membrana de poro 0,45µm. Sua principal vantagem é que permite a inoculação de maiores volumes da amostra, concentrando na membrana os microrganismos presentes na quantidade inoculada. O limite de detecção é de 1 UFC por volume inoculado, sendo indicado para amostras com contagens abaixo do limite de detecção dos outros procedimentos. Porém, a área de exposição para o desenvolvimento bacteriano é pequena, sendo necessária, em muitos casos, a diluição do material para que as Unidades Formadoras de Colônia (UFC) consigam ser quantificadas nos casos em que houver uma contaminação elevada.

O R2A é um meio com baixa quantidade de nutriente, que em combinação com uma menor temperatura de incubação, e um maior tempo de incubação, estimula a recuperação e crescimento dos microrganismos estressados e tolerantes ao cloro.

O R2A é uma formulação com extrato de levedura que fornece uma fonte de oligoelementos e vitaminas. A peptona e os ácidos casamino fornecem nitrogênio, vitaminas, aminoácidos, carbono e minerais. A dextrose serve como fonte de carbono. O amido auxilia na recuperação de organismos lesionados absorvendo subprodutos metabólicos tóxicos. Piruvato de sódio aumenta a recuperação de células estressadas. O fosfato de potássio é usado para equilibrar o pH e fornecer fosfato. O sulfato de magnésio é uma fonte de cátions divalentes e sulfato. Ágar é o agente solidificante.

2. COMPOSIÇÃO

Formulação	Concentração/L
Extrato de levedura	0,5g
Peptona	0,5g
Ácido casamino	0,5g
Dextrose	0,5g
Solução de amido	0,5g
Piruvato de sódio	0,5g
Fosfato de potássio	0,3g
Sulfato de magnésio	0,05g
Ágar	15,0g
Água deionizada	1L

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

3. AMOSTRA

a- Tipos de amostras

- Vários tipos de amostras podem ser inoculadas no R2A, como águas de poços, água de fonte, água mineral, reservatórios, sistema de distribuição, água reagente, entre outras.

- 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 ($\pm 37^{\circ}\text{C}$) 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 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 diagnóstico *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;
- Proveta de 100 ou 250 mL estéril, para medição de volumes de amostra;
- Pinça para transferência das membranas, mergulhadas em etanol;
- Conjunto de filtração previamente esterilizado;
- Bomba de vácuo;
- Membranas de 47 mm de diâmetro, porosidade de 0,45mm, brancas e quadriculadas, estéreis;
- Micropipeta;
- Ponteira estéril;
- Alça de drigalski;
- Bico de Bunsen.

6. PROCEDIMENTO TÉCNICO

6.1 Técnica de Membrana filtrante

- Retirar o pacote de placas da geladeira e separar as placas a serem usadas, retornando o pacote à geladeira;
- Colocar as placas em estufa bacteriológica entre 35-37°C pelo tempo necessário para adquirirem esta temperatura;
- Filtrar volume apropriado (100 mL) de amostra em membrana estéril;
- Retirar a membrana e transferir para a placa de petri contendo o agar R2A, evitando deixar bolhas entre a membrana e a superfície do ágar;
- Incubar as placas invertidas a 30-35°C por até 72 horas.
- Proceda a contagem das colônias e expressar o resultado.
- O resultado da amostra é dado diretamente pelo número de colônias presentes.

Nota: A filtração de 100mL da amostra é o procedimento padrão para análise de água mineral ou potável, na qual espera-se ausência do grupo pesquisado, sendo esse o volume mínimo exigido pela legislação brasileira.

6.2 Técnica em Superfície (Spread plate)

- Retirar o pacote de placas da geladeira e separar as placas a serem usadas, retornando o pacote à geladeira;
- Colocar as placas em estufa bacteriológica entre 35-37°C pelo tempo necessário para adquirirem esta temperatura;
- Inocular 0,1 mL de cada diluição, depositando o inóculo no centro da placa de Petri contendo o meio de cultura.
- Com alça de Drigalski, espalhar o inóculo por toda a superfície do meio.
- Incubar as placas invertidas a 30-35°C por até 72 horas.
- Proceder à contagem das colônias e expressar o resultado.
- Contagem de microrganismos viáveis = $N \times 10$.

7. RESULTADOS

7.1 Técnica de Membrana filtrante

- Proceder a contagem dos microrganismos.
- Expressar o resultado UFC/100mL.

7.2 Técnica em Superfície (Spread plate)

- Proceder a contagem dos microrganismos = $N \times 10$.
- Expressar o resultado UFC/mL.

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:

- O R2A ágar é destinado apenas para água potável tratada.

- Os microrganismos a serem submetidos às análises por esta técnica podem sofrer danos devido à pressão existente no processo de filtração.

- Deve-se colocar a membrana totalmente em contato com o meio de cultura, evitando a formação de bolhas para que o crescimento bacteriano ocorra da forma uniforme e sem falhas sobre a membrana.

- Deve-se atentar ao analisar o resultado do crescimento bacteriano sobre as membranas, onde as mesmas devem ser avaliadas através de luz refletida com as placas inclinadas em um ângulo de aproximadamente 45° contra o fundo branco da membrana. Dependendo do meio de cultura utilizado e das características de certas colônias, as mesmas tendem a ser transparentes e pequenas, onde o resultado pode ficar mascarado se não se atentar à visualização contra uma luz incidente na membrana com o meio de cultura inclinado.

- 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 conseqüentemente 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 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 DE QUALIDADE

- *Materiais necessários*

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

- Controle de qualidade recomendado:

Parâmetros	Resultado esperado	
Produtividade quantitativa - <i>P. Aeruginosa</i> ATCC 27853	PR \geq 0,7 - Contagem obtida em comparação ao ágar PCA	Incubação 30-35°C 48h
Produtividade quantitativa - <i>E. coli</i> ATCC 25922	PR \geq 0,7 - Contagem obtida em comparação ao ágar PCA	Incubação 30-35°C 48h
Produtividade quantitativa - <i>S. Aureus</i> ATCC 25923	PR \geq 0,7 - Contagem obtida em comparação ao ágar PCA	Incubação 30-35°C 48h
Meio não inoculado	Meio ambar claro, pouco opalescente, apresentando um fino precipitado.	

- *Periodicidade*

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

- *Análise dos resultados*

As cepas padrão inoculadas no material devem apresentar características de crescimento esperado. Caso se constate algum problema referente a não recuperação do inóculo de cepas controle, os resultados de 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. APHA. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 5th ed. American Public Health Association, Washington, D.C., 2015.
2. APHA. Standard methods of water and wastewater. 23rd. Ed. Washington, 2017.
3. CODEX ALIMENTARIUS. Code of hygienic practice for collecting, processing and marketing of natural mineral waters (CAC/RCP 33-195, Revisão 2011). Rome: FAO, 2011. FAO/WHO Food Standards Program.
4. Difco Manual, 2nd ed., 2009.
5. ISO 11133. Microbiology of food, animal feed and water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media. 1st ed. The International Organization for Standardization, 2014.
6. SILVA, de Neusely; *et al.* Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água, 5^a ed. São Paulo: Blucher, 2017.

12. PRODUTOS RELACIONADOS

570505 MEMBRANA FILTRANTE MCE EST PORO 0,45µm DIAM 47mm BRANCA QUADR CX100UN



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 041 36619000

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

	Código do produto		Número de lote
	Número de série		Fabricante
	Consultar instruções para utilização		Validade
	Temperatura de armazenagem (limite de temperatura)		Produto para saúde para diagnóstico in vitro.
	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)