

M-CP CLOSTRIDIUM ÁGAR



Finalidade:

Meio seletivo e diferencial para isolamento e contagem de Clostrídios sulfito redutores e *Clostridium perfringens* em água, através da técnica de membrana filtrante.

Registro ANVISA:

10097010149

Apresentação:

540173 - M-CP-AGAR-CLOSTRIDIUM-10mL-PL 60X15-10PL

LB 172224
Rev. 06 - 06/2024

1. INTRODUÇÃO

Este meio foi descrito pela primeira vez por Bisson e Cabelli para a rápida quantificação de *Clostridium perfringens* de uma variedade de amostras de água. O meio, para técnica de filtração, propiciou uma melhor recuperação de *Clostridium perfringens* a partir de amostras de água e esgoto, comparado com o método dos tubos. O procedimento de filtração em membrana é limitado à análise de amostras líquidas limpidas, sem sólidos em suspensão, que possam ser filtradas através de uma membrana de porosidade 0,45µm. A técnica baseia-se na filtração de volumes adequados de água, mediante pressão negativa (vácuo). Essas bactérias, apresentando dimensões maiores que o poro da membrana, ficarão retidas em sua superfície, a qual será então transferida para uma placa de Petri, contendo o meio de cultura seletivo e diferencial Ágar m-CP. Por capilaridade, o meio se difundirá para a membrana, entrando em contato com as bactérias, que após o período de incubação desenvolverão colônias com características típicas. 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 necessário, 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. A quantificação é feita pelo método de contagem em placas, utilizando o m-CP como meio de cultivo. A sacarose e o indoxil β-D glucosídeo presentes no Ágar m-CP são os componentes que permitem a diferenciação dessa bactéria. A fermentação da sacarose é evidenciada pela coloração amarelo palha das colônias, devido à viragem do indicador de pH (púrpura de bromocresol) e a hidrólise do indoxil β-D glucosídeo, pela coloração azul das mesmas. Como *Clostridium perfringens* fermenta a sacarose, mas não fermenta a cellobiose (glicose β-D glucosídeo) não hidrolisando o indoxil β-D glucosídeo, suas colônias apresentam-se com coloração amarela nesse meio. Após o período de incubação, a membrana contendo as colônias típicas em sua superfície, é submetida ao teste para fosfatase ácida através da exposição a vapores do hidróxido de amônio durante 10-30 segundos. O Ágar m-CP contém o difosfato de fenolftaleína em sua composição e, como *Clostridium perfringens* é capaz de produzir a enzima fosfatase ácida, que determina a hidrólise dessa substância, com liberação de fenolftaleína, as colônias típicas desta bactéria irão apresentar uma coloração rosa escuro ou magenta, após exposição a vapores de hidróxido de amônio.

2. COMPOSIÇÃO

Formulação	Concentração/ L
Triptose	60,0g
Extrato de Levedura	40,0g
Sacarose	10,0g
L-Cisteína HCl	2,0g
Sulfato de Magnesio 7H ₂ O	0,2g
Ágar	16,5g
Purpura de Bromocresol	0,08g
Polimixina B	50mg
D-Cicloserina	800mg
Fenolftaleína	0,1%

Cloreto Ferrico. 6H ₂ O	0,09g
Substrato Cromogênico	0,066g
Agua deionizada	1L
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. AMOSTRA

a- Tipos de amostras

- Vários tipos de amostras podem ser inoculadas no M-CP-Agar-Clostridiun, como água de poço, fontes, reservatórios, sistema de distribuição, piscina, água mineral, 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 mantêm 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 pouco a muito, 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 (±37°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. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS (porém não fornecidos)

- 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 0,45µm, brancas e quadriculadas, estéreis;
- Bico de Bunsen.

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 35-37°C pelo tempo necessário para adquirirem esta temperatura;
- c- Filtrar volume apropriado (100 mL) de amostra em membrana estéril;
- d- Retirar a membrana e transferir para a placa de Petri contendo o m-CP Ágar, evitando deixar bolhas entre a membrana e a superfície do ágar.
- e- Incubar as placas em jarra de anaerobiose em estufa a 44±1°C por 18-24 horas;

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.

f- Decorrido o tempo de incubação, observar as placas e caso haja colônias suspeitas, amarelo opacas, remova as tampas das placas de m-CP e exponha a membrana próximo a um frasco contendo hidróxido de amônio por 20-30 segundos (rodar a solução do hidróxido de amônio para liberar emanações suficientes para reagir com as colônias na placa);

g- Faça este procedimento sob uma superfície ou anteparo que te possibilite observar à fumaça emanada;

h- As colônias do *C. perfringens* são cor-de-rosa escura à vermelhas após a exposição às emanações do hidróxido de amônio.

7. RESULTADOS

a- Proceda a contagem das colônias em função de que a reação de cor se desvanece, imediatamente depois da exposição ao hidróxido de amônio, sendo assim proceder à contagem rapidamente.

b- Contar as colônias características e expressar o resultado.

c- O resultado da amostra é dado diretamente pelo número de colônias presentes.

Nota: Os limites aceitáveis para a contagem é de 20 a 80 colônias típicas.

8. LIMITAÇÕES DO MÉTODO

(Riscos Residuais Identificados conforme RDC 36/2015)

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

- 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 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 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:*

Parâmetros	Incubação	Resultado esperado
Produtividade quantitativa <i>Clostridium perfringens</i> ATCC® 13124	44 ± 1°C / 18-24 horas	PR ≥ 0,5 - Contagem obtida em comparação ao Agar TSA / Colônias amarelas opacas
Seletividade qualitativa- <i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	(Anaerobiose)	Inibição Total
PR= Taxa de Produtividade		PR= nº de colônias meio teste / nº de colônias meio referência (TSA)
Meio não inoculado		Meio sólido levemente opaco, com coloração roxa, podendo apresentar pequenos precipitados.

- *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 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. 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. 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. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução RDC nº 275 de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnica de Características Microbiológicas para Água Mineral Natural e Água Natural. D.O.U. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 23 de setembro de 2005.
2. APHA. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 5th ed. American Public Health Association, Washington, D.C., 2015.
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. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB). L5.403 *Clostridium perfringens* - Determinação em amostras de água pela técnica de membrana filtrante (método de ensaio). São Paulo. 2004. 23p.
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.



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 Européia
	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)