

PLATE COUNT ÁGAR (PCA)



Finalidade:

Meio nutritivo destinado à contagem de microrganismos, ou manutenção de culturas de bactérias.

Registro ANVISA:

10097010137

Apresentação:

530108 - PLATE COUNT-AGAR-FR 100mL
540171- PLATE COUNT-AGAR-TTC-20ML-PL 90X15-10PL
542566 - PLATE COUNT-AGAR-20mL-PL 90X15-PC 10PL
910270 -PLATE COUNT-AGAR-FR 100mL

LB 172076
Rev. 12 – 08/2024

1. INTRODUÇÃO

A Contagem Total de Aeróbios Mesófilos em placas, (Aerobic Plate Count), também denominada como Contagem Padrão em Placas, é o método mais utilizado como indicador geral de populações bacterianas em alimentos, águas, entre outros. A Contagem Total de Aeróbios Mesófilos não diferencia tipos de bactérias, sendo utilizada para se obter informações gerais sobre a qualidade de produtos, práticas de manufatura, matérias primas utilizadas, condições de processamento, manipulação e vida de prateleira.

O acréscimo do TTC (Cloro de Tetrafenil-tetrazólio) permite que as colônias que eventualmente se desenvolvam no meio corem em tonalidade vermelha, facilitando assim sua visualização.

Este meio é recomendado para contagem de Aeróbios Mesófilos pelo método de plaqueamento em superfície (spread plate) e plaqueamento em profundidade (pourplate).

O plaqueamento em superfície é considerado vantajoso, pois não expõe os microrganismos ao calor do meio fundido, permite a visualização de características morfológicas e diferenciais de colônias. Sua principal desvantagem é que o volume inoculado é limitado à capacidade de absorção de líquido pelo meio de cultura, que não permite a inoculação de mais do que 0,5mL por placa. O procedimento padrão é a inoculação de 0,1mL/placa de cada diluição, com limite de detecção de 100 UFC/g para produtos sólidos ou 10 UFC/mL para produtos líquidos.

O plaqueamento em profundidade tem limite de detecção de 10 UFC/g para produtos sólidos ou 1 UFC/ml para produtos líquidos. Esse procedimento pode ser adaptado, se necessário, para limite de detecção de 1 UFC/g para produtos sólidos.

O PCA é formulado de acordo com a Associação Americana de Saúde Pública (APHA), onde possui em sua formulação digestão enzimática de caseína que fornece aminoácidos e outras substâncias nitrogenadas complexas que são necessárias para o crescimento microbiano. O extrato de levedura fornece, principalmente, o complexo de vitaminas B e a dextrose é uma fonte de energia. O TTC é reduzido para o formazan insolúvel dentro da célula bacteriana produzindo colônias vermelhas.

2. COMPOSIÇÃO

Códigos: 530108, 542566 e 910270

Formulação	Concentração/L
Digestão Pancreática de Caseína	5,0g
Extrato de levedura	2,5g
Dextrose	1,0g
Ágar	15,0g
Água deionizada	1L

Código: 540171

Formulação	Concentração/L
Digestão Pancreática de Caseína	5,0g
Extrato de levedura	2,5g

Dextrose	1,0g
Cloro de Tetrafenil-tetrazólio	0,05g
Ágar	15,0g
Água deionizada	1L

Para ambas as composições, a fórmula pode ser ajustada e/ou suplementada, conforme necessidade, para cumprir os critérios de desempenho.

3. AMOSTRA

a- Tipos de amostras

- O Plate Count Agar é usado para obter contagens microbianas do leite e dos produtos lácteos, alimentos, águas e de outros materiais de importância sanitária.

- 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 conforme tabela abaixo, 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.

Apresentação	Temperatura de armazenamento
540171 e 542566 (placas 90x15)	2 a 25°C
530108 e 910270 (frasco)	Temp. ambiente

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. Como alternativa o laboratório também pode utilizar um dos procedimentos abaixo:

- Secar a água condensada em temperatura ambiente, antes de sua utilização.

- Incubar as placas em estufa ($\pm 37^{\circ}\text{C}$), antes da sua utilização, para redução do tempo de secagem ou estabilização.

- Secar as placas com as tampas entreabertas em fluxo laminar, antes da sua utilização, 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 é destinado apenas para o uso *in vitro*;

- Seu uso é 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 utilizado, 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;

- Pipetas/ ponteiras estéreis;

- Alça bacteriológica (ou outros aparatos para dispensação de amostra);

- Banho-maria;

- Bico de Bunsen.

6. PROCEDIMENTO TÉCNICO

6.1 Técnica em Superfície (Spread plate)

a- Retirar o pacote de placas da geladeira e separar as placas a serem utilizadas, retornando o pacote à geladeira;

b- Colocar as placas em estufa bacteriológica entre $35-37^{\circ}\text{C}$ pelo tempo necessário para adquirirem esta temperatura;

c- Realizar a diluição da amostra conforme procedimento do laboratório;

d- Inocular as amostras nas placas de acordo com a técnica estabelecida pelo laboratório;

e- Incubar as placas em estufa bacteriológica de acordo com a técnica estabelecida pelo laboratório;

f- Após a incubação, realizar a avaliação do crescimento e proceder à contagem de colônias conforme técnica adequada.

Nota 1: No ágar com TTC, para gram positivos recomenda-se incubar por 48 horas pelo retardo de crescimento causado por este componente;

Nota 2: No meio com TTC as colônias coram em tonalidade vermelha.

6.2 Técnica em profundidade (Pourplate)

a- Fundir o meio de cultura;

b- Resfriar o meio de cultura fundido a $44-46^{\circ}\text{C}$;

c- Realizar a diluição da amostra conforme procedimento do laboratório;

d- Inocular as amostras em placas de petri estéreis, de acordo com a técnica estabelecida pelo laboratório;

e- Verter nas placas inoculadas o meio de cultura previamente fundido e resfriado a $44-46^{\circ}\text{C}$, verter aproximadamente 15 mL de meio de cultura ou o volume indicado pelo método seguido pelo laboratório;

f- Misturar o inóculo com o meio de cultura movimentando suavemente as placas, em superfície plana, em movimentos em forma de oito ou em movimentos circulares, nos sentidos horário e anti-horário;

g- Permitir que o meio esfrie e solidifique;

h- Incubar as placas em estufa bacteriológica de acordo com a técnica estabelecida pelo laboratório;

i- Após a incubação, realizar a avaliação do crescimento e proceder à contagem de colônias conforme técnica adequada.

7. RESULTADOS

Realizar a contagem das colônias e calcular o resultado conforme o método de análise seguido pelo laboratório, ou seguir as orientações descritas abaixo:

a- Proceder a contagem das colônias;

b- Calcular o resultado conforme a fórmula:

$$\text{UFC/mL ou UFC/g} = M \times (1/V) \times D$$

Onde:

M: Média das colônias obtidas em placas da mesma diluição;

V: Volume inoculado nas placas;

D: Inverso da diluição inoculada, referente às placas onde foram obtidas as contagens.

c- Expressar o resultado UFC/mL ou UFC/g.

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 Plate Count Agar para plaqueamento em profundidade apresenta algumas limitações, a principal delas sendo a necessidade de fusão do meio de cultura antes do uso. Não podendo ser reaquecidos mais que uma vez.

- A única restrição feita ao TTC é que esta substância causa um crescimento mais lento para microrganismos Gram-positivos (como estafilococos e estreptococos).

- Tempo longo entre a semeadura da amostra e análise.

- Incubação em temperatura inadequada.

- Sobrecarga de inóculo ou falta de inóculo.

- 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>E. coli</i> ATCC 25922	PR \geq 0,7 - Contagem obtida em comparação ao ágar TSA*	Incubação 30-35°C por 72h
Produtividade quantitativa - <i>S. aureus</i> ATCC 25923	PR \geq 0,7 - Contagem obtida em comparação ao ágar TSA*	Incubação 30-35°C por

		72h
<i>Meio não inoculado</i>	Meio sólido levemente opaco, com coloração bege a levemente amarelada, livre de precipitados ou partículas visíveis.	

* Inóculo aproximado de 100 UFC

Inóculo aproximado de <100 UFC (para testes no cód.910270)

- 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 constata 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 4833-1. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Part 1: Colony count at 30°C by the pour plate technique. The International Organization for Standardization, 1st edition, 2013.
6. ISO 4833-2. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Part 2: Colony count at 30°C by the surface plate technique. The International Organization for Standardization, 1st edition, 2013, Corrigendum 1, 2014.
7. 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.

8. Portaria Consolidada nº5, de 8 de setembro de 2017. Anexo XX.

9. 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 041 36619000

www.laborclin.com.br

Responsável Técnico:

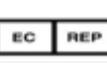
Maire Wakamori – CRF/PR-20176

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 <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)