LACTOSE SULFITO

Finalidade:

Meio de cultura seletivo e diferencial destinado a testes para identificação de *Clostridium perfringens.*

Registro ANVISA:

10097010134

LB 172232
Rev. 06 – 09/2024

Apresentação:

511258 - LACTOSE SULFITO-8mL-TB16X150-CX10TB

1. INTRODUÇÃO
O meio contem triptona e extrato de leveduras, as quais fornecem compostos nitrogenados essenciais para o desenvolvimento das espécies de clostrídios. A lactose é a fonte de carbono, e a produção de gás, formada devido à fermentação da lactose, é observada no tubo de Durham. A cisteina fornece as condições de redução do sulfito e o citrato de amônio e ferro age como indicador, a redução do sulfito, é evidenciada através da formação de precipitado negro na base do tubo.
As cepas de *Clostridium perfringens* produzem gás ao fermentar a lactose e reduzem o sulfito a 46ºC.
O teste da redução do sulfito é uma das características mais usadas para a identificação de *Clostridium perfrigens* na análise de alimentos.
Para a obtenção do meio completo é necessária à suplementação com solução de Citrato férrico amoniacal e solução de Bissulfito de sódio.

2. COMPOSIÇÃO

Formulação	Concentração/ L
Triptone	5,0g
Lactose	10,0g
Cloreto de sódio P.A.	2,5g
Extrato de leveduras	2,5g
L-cisteina monohidratada	0,3g
Agua deionizada	1L
pH 6,4±0,2 a 25ºC	

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

3. AMOSTRA
a- Tipos de amostras
- Amostras de alimentos que necessite confirmação de *Clostridium perfringens*.
- 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 os tubos devem ser armazenados em temperatura de 2 a 12ºC, 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.
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, antes de sua utilização, em temperatura ambiente, podendo utilizar a incubação em estufa (± 37ºC) 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 produto ou expor o produto a contaminações.

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 tubos 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 121ºC 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;
- Micropipeta;
- Ponteiras estéreis;
- Fogareiro;
- Bico de Bunsen;
- Solução de Citrato Férrico Amoniacal e Solução de Bissulfito de sódio.

6. PROCEDIMENTO TÉCNICO
a- Retirar da embalagem a quantidade de tubos a ser usada (devolver o restante à geladeira). Eliminar qualquer bolha que exista dentro dos tubos Durham;
b – Colocar os tubos com a tampa frouxa em banho-maria fervente por 5 minutos;
c – Resfriar os tubos em banho de gelo (desaeração);
d- Preparo do Caldo Lactose Sulfito (LS): Adicionar 500µL da Solução de CITRATO FERRICO AMONIACAL e 500µL da solução de BISSULFITO DE SÓDIO.

e- Inocular 5 gotas (250µL) da suspensão do Caldo Tioglicolato (contendo a cultura de 18-24h da bactéria a ser testada) no meio LS Suplementado, fechar bem a tampa;
f- Incubar os tubos a 46±0,5°C/18-24h.
g- Após a incubação, verificar se ocorreu escurecimento do meio (redução do sulfito) e produção de gás no tubo de Durham.

Nota: Para os testes com *C. perfringens* não utilizar vortex, homogeneizar suavemente.

7. RESULTADOS
- Considerar confirmadas como *Clostridium perfringens* as culturas com escurecimento do meio e com pelo menos um quarto do tubo de Durham preenchido pelo gás;
- Nos casos em que a quantidade de gás seja menor do que um quarto do tubo de Durham, transferir 5 gotas (250µL) de cultura obtida no Caldo LS para um novo tubo de LS e repetir a leitura após 18-24h de incubação a 46±0,5°C.

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.
- A não utilização de suspensões bacterianas previamente preparadas em caldo tioglicolato fornecem resultados falsamente negativos.
- A não fervura dos meios antes de sua inoculação fornecem resultados falsamente negativos.
- A homogeneização violenta dos tubos através de vórtex após inoculação irá favorecer a entrada de oxigênio e fornecem resultados falsamente negativos.
- A não retirada de bolhas de ar do tubo de duhran após sua inoculação fornecem resultados falsamente positivos.
- Sobrecarga de inóculo ou falta de inóculo. Inóculos mais carregados fornecem resultados falsamente positivos e inóculos mais fracos fornecem 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.
- A não incubação dos tubos com a tampa bem fechada pode ocasionar falsos resultados negativos, por entrada de oxigênio.
- A não utilização de suplementos fornecidos pela Laborclin pode ocasionar falsos resultados negativos ou positivos.
- Erro na conservação do produto pode ocasionar desidratação do meio e alteração das propriedades dos componentes
- Deve-se evitar o uso de materiais que possam contaminar os reagentes, tais como ponteiras plásticas de micropipetador reaproveitadas.
- Armazenamento ou transporte de amostra inadequado.
- Não utilizar a proporção amostra reagente sugerida na técnica.

9. CONTROLE DA QUALIDADE
- Materiais necessários
Cepas padrão: ATCC® (*American Type Culture Collection)* ou derivadas).

- Controle de qualidade recomendado:

Parâmetros	Resultado esperado	
Produtividade qualitativa - *C. perfringens* ATCC 13124	Crescimento bom/ formação de gás/ precipitado negro	Incubação 46°C/24h
Produtividade qualitativa - *S. aureus* ATCC 25923	Crescimento/ ausência de gás/ ausência de precipitado negro	Incubação 46°C/24h
Meio não inoculado	Meio líquido e transparente a ligeiramente opalescente, ligeiramente amarelado, homogêneo, livre de precipitados ou partículas visíveis.	

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

- Análise dos resultados
Os tubos do Meio de lactose sulfito testados com cepas padrão devem expressar os resultados esperados. Caso se constate algum problema, 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 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
1. APHA: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 5*th* ed. American Public Health Association, Washington, D.C., 2015.
2. BEERENDS, H., CRIQUELION, J., LEPAGE, C., ROMOND, CD. Dénombrement en mileu liquide de *Clostridium perfringens* dands les aliments. Ann, Fals. Chim. 74:181-184. 1981.
3. ISO 7937:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of Clostridium perfringens.
4. ISO 11133:2014. Microbiology of food, animal feed and water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media. 1rd ed. The International Organization for Standardization.
5. SILVA, de Neusely; *et al*. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água, 5ª 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

	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 Europeia
	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)