

Finalidade:

Meio seletivo e diferencial para isolamento e contagem de Clostrídios sulfito redutores e *Clostridium perfringens*.

Registro ANVISA:

Não aplicável

Apresentação:

530169 - C P TSC AGAR CLOSTRIDIUM 10X10mL CX

LB 172244
Rev 04 – 09/2024

1. INTRODUÇÃO

Os Clostrídios sulfito redutores são bacilos, Gram positivos, anaeróbios estritos, capazes de formar esporos e apresentam atividade sulfito redutora.

O *Clostridium perfringens* é uma bactéria patogênica cujas doenças transmitidas por alimentos são classificadas em dois grupos de risco. As cepas do tipo A, muito comuns, são classificadas como perigo moderado, de curta duração e sem ameaça de morte. Já as cepas do tipo C (enterite necrótica), muito mais raras, inclui as doenças de perigo severo, com ameaça de morte, sequelas crônicas ou de longa duração.

O Ágar Triptose Sulfito Cicloserina (TSC) foi originalmente formulado por Harmon *et al* para a enumeração de *C. perfringens* a partir de alimentos. O Ágar TSC tem sido documentado como um dos meios mais úteis para a recuperação quantitativa de *C. perfringens* enquanto suprime o crescimento de outros anaeróbios facultativos. O Ágar Base também é recomendado pela APHA.

A peptona de carne, peptona de soja e extrato de levedura fornecem nutrientes essenciais e vitaminas para o desenvolvimento de Clostrídios. As bactérias positivas para H₂S reduzem o sulfito (do bissulfito de sódio) no meio de cultura para o sulfeto, que forma um sal negro com citrato férrico de amônio (FeS). As colônias negras devem ser consideradas como presuntivas para *Clostridium perfringens* em TSC Agar e precisam de testes confirmatórios como redução de nitrato, fermentação de lactose, liquefação de gelatina e ausência de motilidade. A cicloserina inibe a flora bacteriana associada, é a razão pela qual algumas colônias inibidas parecem menores. Também reduz o escurecimento difuso em torno do *Clostridium perfringens*.

2. COMPOSIÇÃO

Formulação	Concentração/ L
Extrato de leveduras	5g
Proteose peptona 3	7,5g
Digesto pancreático de caseína	7,5g
Soytone	5g
Citrato férrico amoniacal	1g
Bissulfito de sódio	20g
D-cicloserina	0,42g
Água Deionizada	1000mL
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. AMOSTRAS

a- Tipos de amostras

- A amostra consiste em alimentos nos quais se pretende pesquisar a presença de Clostrídios sulfito redutores e *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 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 em temperatura de 2 a 12°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 pouco a muita, acumulando água.

Conforme descrito em literatura, o laboratório deve retirar da refrigeração apenas a quantidade de produto que deverá ser utilizada em sua rotina.

b- Precauções e cuidados especiais

- O produto é 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 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
- Bico de Bunsen
- Jarra de anaerobiose
- Gerador de anaerobiose
- Indicador de anaerobiose

6. PROCEDIMENTO TÉCNICO

a- Retirar a caixa da refrigeração, e em ambiente asséptico, separar os frascos a serem usados, devolvendo o restante ao refrigerador;

- b- Fundir os frascos em banho-maria e mantê-los até a utilização em estufa de 55°C para não solidificar novamente.
- c- Adicionar 0,1 mL de cicloserina 4%, que acompanha o kit em cada 10 mL de meio base;
- d- Preparar as diluições de água peptonada 0,1%;
- e- Inocular 1 mL em placas de Petri vazias estéreis e adicionar o CP TSC ágar suplementado com cicloserina, em duplicata;
- f- Homogeneizar, girando suavemente as placas em movimentos em 8.
- g- Aguardar que as placas solidifiquem e adicionar uma sobrecamada do meio CP TSC ágar suplementado com cicloserina;
- h- Aguardar a solidificação da sobrecamada e incubar as placas em estufa a 46°C por 24h, em atmosfera anaeróbica, utilizando jarra e sistema gerador de anaerobiose;
- i- Selecionar as placas com menos de 150 colônias e fazer a contagem das colônias características.
- j- Contar as colônias características.

7. RESULTADOS

- As colônias pretas, típicas de clostrídios sulfite redutores em CP TSC (Tryptose-sulfite-cycloserine ágar).

Nota: A confirmação das colônias típicas deve ser realizada conforme procedimento já estabelecido pelo laboratório.

- Considerar como *Clostridium perfringens* todas as culturas com as seguintes características: fermentação da lactose (+), hidrólise da gelatina (+), redução do nitrato (+) e motilidade (-).
- Calcular o número de UFC/g ou mL em função do número de colônias típicas, diluição inoculada e percentagem de colônias confirmadas.

Ex: Plaqueamento em profundidade, diluição 10^{-2} , 25 colônias típicas, 10 submetidas à confirmação, 8 confirmadas (80%)
 $UFC/g = 25 \times 10^2 \times 0,8 = 2,0 \times 10^3$

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.
- Sobrecarga de inóculo ou falta de inóculo. Placas com inóculos mais carregados fornecem 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
- A não incubação dos meios em jarra de anaerobiose apropriado, contendo geradores de anaerobiose adequados pode ocasionar falsos resultados negativos.
- A não utilização de suplemento fornecido juntamente com os frascos pode ocasionar falsos resultados negativos ou positivos.

8. CONTROLE DA QUALIDADE

- *Materiais necessários*

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

- *Controle de qualidade recomendado:*

Parâmetro	Resultado esperado	
Produtividade qualitativa <i>C. perfringens</i> ATCC 13124	Crescimento bom	33-37°C/24h
Meio não inoculado	Meio base: Meio Âmbar sólido sem precipitados ou partículas suspensas Solução de cicloserina: Solução transparente sem precipitados e partículas suspensas.	

- *Periodicidade*

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

- *Análise dos resultados*

O CP TSC Ágar testado com cepas padrão deve expressar os resultados esperados. Caso se constate algum problema, os resultados não devem ser liberados até que as causas tenham sido apuradas devidamente e os problemas constatados sanados

9. 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.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APHA. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 5th ed. American Public Health Association, Washington, D.C., 2015.
2. ISO 11133. Microbiology of food, animal feed and water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media. 1rd ed. The International Organization for Standardization, 2014.
3. ISO 7937. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of Clostridium perfringens-colony-count technique, 3rd ed., 2015.
4. SILVA, de Neusely; et al. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água, 5^a ed. São Paulo: Blucher, 2017.

11. PRODUTOS ASSOCIADOS

570300 - BAG PARA ATMOSFERA ANAEROPOUCH CX 10UN

570301 - JARRA PARA ATMOSFERA ANAEROPACK 2,5L CX 01UN

570302 - JARRA PARA ATMOSFERA ANAEROPACK 7L CX 01UN
570309 - GERADOR ANAEROBIOSE ANAERPOUCH
S/INDICADOR CX 10UN
570310 - GERADOR ANAEROBIOSE ANAEROPACK
S/INDICADOR CX 5UN
570311 - INDICADOR ANAEROBIOSE PC 10UN



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 armazenamento / limite		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 reutilizar		Não reesterilizar

Fonte: ABNT NBR ISO 15223-1 – Terceira edição (24.08.2022)