

**Finalidade:**

Meio cromogênico que detecta simultaneamente coliformes totais e *E. coli*, permite a identificação presuntiva e enumeração destes microrganismos em água potável e bebidas não alcoólicas, conforme as exigências ISO.

**Registro ANVISA:**

Não Aplicável

**Apresentação:**

540213 - M-ECC-AGAR-COLIF/EC-10mL-PL 60X10 - 10PL

LB 172260  
Rev 04 – 09/2024

## 1. INTRODUÇÃO

O m-ECC Ágar é um meio de cultura cromogênico seletivo e diferencial, desenvolvido para uso em laboratórios de microbiologia em análise de águas e bebidas de baixa flora microbiana, pela técnica de filtração. Dentro de 24 horas, este meio permite a detecção, diferenciação e contagem de *E. coli* e coliformes totais. 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 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 m-ECC Ágar. 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 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. A quantificação é feita pelo método de contagem em placas, utilizando o M-ECC como meio de cultivo. É uma formulação com peptonas adicionadas ao piruvato, sorbitol e tampão fosfato garantem um crescimento rápido das colônias. O Tergitol® 7, age como um inibidor de bactérias Gram positivas, e não tem nenhum efeito negativo sobre o crescimento de coliformes e *E. coli*. A combinação de dois substratos cromogênicos permitem a simultânea detecção de coliformes totais e *E. coli*. A enzima característica para coliformes é a β-D-galactosidase que cliva o substrato Salmon-GAL resultando na coloração rósea a vermelha das colônias de coliformes. O substrato X-glucuronide é usado para a identificação da β-D-glucuronidase que é característico de *E. coli*. A *E. coli* cliva ambos os substratos Salmon-GAL e X-glucuronide, de modo que colônias positivas assumem uma cor azul escuro para violeta. Estes são facilmente distinguidos das outras colônias de coliformes que tem cor rósea a vermelha. A inclusão de triptofano melhora a reação do indol, aumentando desse modo a confiabilidade da detecção quando é usada em combinação com a reação Salmon-GAL e X-glucuronida, como parte de uma confirmação adicional para *E. coli*.

## 2. COMPOSIÇÃO

Formulação	Concentração/ L
Peptona	1,0g
Extrato de levedura	2,0g
Cloreto de sódio	5,0g
Di-hidrogenofosfato de sódio	2,2g
Fosfato de hidrogênio di-sódio	2,7g

Piruvato de Sódio	1,0g
Sorbitol	1,0g
Triptofano	1,0g
Tergitol®	0,15g
6-cloro-3-indoxil-beta-Dgalactopyranoside (Salmon-GAL)	0,2g
5-bromo-4-cloro-3-indoxil-beta-D-glucuronico ácido	0,1g
Isopropil-beta-Dthiogalactopyranoside	0,1g
Ágar	9,0-18,0g
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 inoculados no m-ECC, como água potável, água mineral, água de piscina submetida a tratamento bactericida, água de sistema de distribuição, refrigerantes, outros produtos líquidos e produtos sólidos que possam ser transformados numa solução límpida, como sal e açúcar, por exemplo.

- 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 pouco 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 (±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;
- Alça bacteriológica;
- Bico de Bunsen.

### 6. PROCEDIMENTO TÉCNICO

- a- Retirar o pacote da geladeira, e em ambiente asséptico, separar as placas a serem usadas, devolvendo a seguir as não utilizadas;
  - b- Colocar as placas em estufa bacteriológica a 37°C pelo tempo necessário para adquirirem esta temperatura;
  - c- Filtrar volume apropriado (100 mL ou outro volume adequado, conforme método seguido pelo laboratório) de amostra em membrana estéril;
  - d- Retirar a membrana e transferir para a placa de Petri contendo o ágar m-ECC, evitando deixar bolhas entre a membrana e a superfície do ágar;
  - e- Incubar o material em estufa bacteriológica a 36±2°C por 21-24h.
- Nota 1:** 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- Havendo crescimento, analisar o desenvolvimento de cor no meio, verificando:
  - g- Presença de colônias azuis escuras a roxas: *E. coli*;
  - h- Presença de colônias róseas a vermelhas: coliformes totais (considerar como presuntiva);
  - i- Presença de colônias sem coloração específicas: outras bactérias.
  - j- Para confirmação das colônias róseas a vermelhas, submeter preferencialmente todas ou pelo menos 10 colônias ao teste de oxidase;
  - l- **Teste de oxidase:** Com uma alça bacteriológica espalhar uma pequena quantidade da cultura na tira de oxidase, observando se ocorre o desenvolvimento de uma cor azul intensa, em aproximadamente 10 segundos (teste positivo). O não

desenvolvimento da cor azul no intervalo de um minuto indica teste negativo.

**Nota 2:** Os coliformes são oxidase negativa.

### 7. RESULTADOS

a- Contar as colônias características e expressar o resultado:

- Para Coliformes totais: somar todas as colônias róseas a vermelhas, oxidase negativas, com as colônias azuis escuras ou roxas.

Expressar resultado em UFC de Coliformes totais pelo volume inoculado.

- Para *E. coli*: contar todas as colônias azul escuras ou roxas. Expressar resultado em UFC de *E. coli* pelo volume inoculado.

### 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:

- Algumas cepas de *E. coli* (3-4%) são β-glucuronidase negativos e aparecem como colônias de cor rosa a vermelho, por exemplo, cepas de *E. coli* O157.
- Flora acompanhante aparece como colônias incolores, com exceção de alguns organismos, que possuem atividade β-D-glucuronidase. Estas colônias aparecem na cor azul claro a turquesa.
- 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 DA 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≥0,5 – Contagem obtida em comparação ao ágar TSA / colônias roxas - azuladas	Incubação 33-37°C 24h
Produtividade quantitativa - <i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	PR≥0,5 – Contagem obtida em comparação ao ágar TSA / colônias rosas	Incubação 33-37°C 24h
Seletividade qualitativa - <i>S. aureus</i> ATCC 25923	Inibição	Incubação 33-37°C 24h
Meio não inoculado	Meio sólido, levemente opaco, coloração bege a levemente amarelada, livre de precipitados ou partículas visíveis.	

#### - 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;
- que os materiais estejam sendo armazenados nas condições indicadas;
- que 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](http://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](mailto: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 n° 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. ISO 9308:1. Water quality - Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria - Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora, 3rd ed. The International Organization for Standardization, 2014.
5. Ministério da Saúde, Portaria de consolidação n°5, de 28 de setembro de 2017.
6. SILVA, de Neusely; *et al.* Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água, 5ª ed. São Paulo: Blucher, 2017.

### 12. PRODUTOS ASSOCIADOS

570661 TIRA DE OXIDASE FR 10 TIRAS



#### 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](http://www.laborclin.com.br)

#### Responsável Técnico:

Maire Wakamori – CRF/PR-20176  
Serviço de Assessoria ao Cliente  
SAC 0800-0410027  
[sac@laborclin.com.br](mailto: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)