

Finalidade:

Meio confirmatório para contagem de coliformes em leite materno.

Registro ANVISA:

10097010149

Apresentação:

510178 - BRILLIANT GREEN 5%-10mL-TB16X150-CX10TB

LB 172216
Rev. 05 – 09/2024

1. INTRODUÇÃO

Todo leite humano doado ao Banco de Leite Humano (BLH) deverá ser submetido aos procedimentos de seleção, classificação e pasteurização. Uma vez concluídas essas etapas, o BLH deverá estocar o produto, ainda cru, para futuro processamento/pasteurização ou iniciar imediatamente o processamento/pasteurização e controle de qualidade pós-pasteurização.

A partir do procedimento clássico para detecção de coliformes totais, foi desenvolvida uma metodologia alternativa que consiste na inoculação de quatro alíquotas de 1 mL cada de leite humano ordenhado pasteurizado, pipetadas de forma independente e inseridas em tubos com 10 mL de caldo bile verde brilhante 5% com tubos de Durham em seu interior. Uma vez que o objetivo da pasteurização é eliminar 100% das bactérias patogênicas, a presença de coliformes em amostra de leite pasteurizado caracteriza o produto como impróprio para consumo.

O caldo brilliant green contém dois inibidores que são o Oxgall e o corante verde brilhante. Organismos, principalmente coliformes, que são resistentes à ação dos inibidores e que fermentam a lactose, são capazes de replicar neste meio. A fermentação é detectada devido a produção de gás.

2. COMPOSIÇÃO

Formulação	Concentração/ L
Peptona	10,0g
Sais Biliares (Oxgall)	20,0g
Lactose	10,0g
Verde Brilhante	17mg
pH 7,2± 0,2 a 25°C	

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 leite materno que necessitem confirmação de coliformes totais.
- 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 12°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.

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 ($\pm 37^\circ\text{C}$) 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 produto ou expor o produto a contaminações.

b- Precauções e cuidados especiais

- 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;
- 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;
- O procedimento de descarte do produto se baseia na RDC 222 (ANVISA) de 28 de março de 2018, que regulamenta as boas práticas de gerenciamento dos resíduos de serviços de saúde.
- Para acondicionamento do material a ser autoclavado, recomendamos o uso dos sacos para autoclavagem - Detrilab.
- Contate o serviço de vigilância sanitária de sua região para garantir o cumprimento correto da legislação de descarte de produtos potencialmente contaminantes.

5. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS (porém não fornecidos)

- Estufa bacteriológica;
- Micropipeta;
- Ponteiras estéreis;
- Alça bacteriológica;
- Bico de Bunsen.

6. PROCEDIMENTO TÉCNICO

6.1 Coleta de Leite humano ordenhado pasteurizado (LHOP) para análise

- a- Após o tratamento térmico (pasteurização e resfriamento), manter os frascos do LHOP sob cadeia de frio;
- b- Retirar um frasco por vez para coleta das alíquotas e retorná-los imediatamente à cadeia de frio;
- c- Coletar, sob campo de chama ou em cabine de segurança biológica, 4 alíquotas de 1mL da amostra a ser analisada. As alíquotas deverão ser coletadas em pontos diferentes do frasco;
- d- Semear todas as alíquotas de uma mesma amostra em um único tubo de cultura contendo 10mL de Caldo Verde Bile Brilhante 5%;
- e- Tampar os tubos contendo o leite com o meio de cultura e incubá-los a $36\pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 a 48 horas, em estufa.

6.2 Determinação de Coliformes Totais

a- A determinação da presença ou ausência dos coliformes totais se dá pela observância da formação de gás no interior dos tubos de Durham.

b- São considerados positivos para coliformes aqueles tubos que contenham em seu interior tubos de Durham com formação de bolha (gás), no período de 24 a 48 horas de incubação.

c- A presença de gás indica um resultado presuntivo, que deverá ser submetido à prova confirmatória, obrigatoriamente.

6.3 Prova Confirmatória

a- A prova confirmatória para presença de coliformes se faz utilizando os tubos com resultados considerados positivos.

b- Coletar, sob campo de chama ou cabine de segurança biológica, com auxílio do pipetador automático de 0,05mL com ponteiros descartáveis, amostra do tubo com presença de gás em Caldo Verde Bile Brilhante 5% e inocular no Caldo Verde Brilhante 4%.

c- Incubar os tubos com o meio Caldo Verde Bile Brilhante 4% em estufa a 36±1°C, por 48 horas.

7. RESULTADOS

a- Consideram-se como resultado positivo final, aqueles tubos em que houve a formação de gás no teste confirmatório.

b- Os resultados serão expressos como ausência e presença de Coliformes Totais.

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.
- Incubação em temperatura inadequada.
- 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.
- Erro na conservação do produto pode ocasionar 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	
Especificidade – <i>E. coli</i> ATCC 25922	Turvação com produção de gás	33-37°C/24h
Especificidade – <i>E. faecalis</i> ATCC 29212	Inibição total a Inibição parcial	33-37°C/24h
Meio não inoculado	Meio de coloração verde esmeralda, clara, livre de precipitados, com tubo de Durham.	

- *Periodicidade*

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

- *Análise dos resultados*

Os tubos de Brilliant Green testados com cepas padrão devem expressar os resultados esperados. Caso se constate algum problema, os resultados de amostras clínicas 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. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 171, de 4 de setembro de 2006. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o Funcionamento de Bancos de Leite Humano. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 5 set. 2006.
2. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Banco de leite humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. – Brasília: Anvisa, 2008.
3. Difco Manual, 2nd edição 2009.
4. FIOCRUZ (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ). *Programa Nacional de Qualidade em Bancos de Leite Humano*. Rio de Janeiro, 2003.
5. NOVAK, F. R. O leite humano: qualidade e controle. In: SANTOS JUNIOR, L. A. (Org.). *Fisiologia e patologia da lactação*. Natal: Sociedade Brasileira de Mastologia, 1995.



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 <i>in vitro</i>
	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 oxido 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 de luz solar e longe do calor		Somente para avaliação de desempenho de IVD
	Não reutilizar		Não reesterilizar

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