



MicroSnap® Coliformes e *E. coli*

Para utilizar:

Opções de enriquecimento

- Nº do produto MS1-CEC (Dispositivo de enriquecimento de coliformes e *E. coli* MicroSnap®)
- Nº do produto MS1-N-BROTH-9ML (Caldo de nutrientes melhorado MicroSnap® em frascos de 9 mL)
- Nº do produto MS1-EB-BROTH-9ML (MicroSnap® Enhanced EB Broth em frascos de 9 mL)

Opções de detecção

- Nº do produto MS2-COLIFORM (Dispositivo de detecção de coliformes MicroSnap®)
- Nº do produto MS2-ECOLI (Dispositivo de detecção MicroSnap® *E. coli*)



Introdução

Descrição e utilização prevista

MicroSnap® Coliform e *E. coli* são testes bioluminogénicos rápidos para a detecção e enumeração de coliformes e *Escherichia coli* em produtos e amostras ambientais em 6 ou 8 horas. O MicroSnap Coliform e *E. coli* consiste de um Dispositivo de Enriquecimento que contém um meio de crescimento específico e um Dispositivo de Detecção que contém um substrato bioluminogénico no qual a reação de detecção é medida utilizando um luminómetro portátil da Hygiena®.

O procedimento de teste em duas fases requer um curto período de incubação para facilitar a recuperação das bactérias, seguido de uma fase de detecção. O tempo de incubação de uma amostra é determinado pelo nível de sensibilidade necessário. Durante a incubação, as bactérias utilizam os recursos alimentares disponíveis no meio e produzem mais beta-galactosidase e beta-glucuronidase, que são as enzimas de diagnóstico necessárias para a reação bioluminogénica.

Após a incubação, uma pequena quantidade de solução enriquecida do Dispositivo de Enriquecimento é transferida para o Dispositivo de Detecção, ativada, incubada durante 10 minutos e depois medida em um luminómetro EnSURE® Touch. Os substratos específicos reagem com as enzimas de diagnóstico para produzir luz. Quanto maior for o número de bactérias na amostra, maior será a concentração do biomarcador e maior será a produção de luz. A luz é medida em poucos segundos. A unidade de medida é a unidade formadora de colónias (UFC). A saída de luz é diretamente proporcional à concentração inicial de contaminação bacteriana em amostras pré-enriquecidas.

Algumas matrizes, como suspensões líquidas opacas ou amostras com valores de pH extremos, podem exigir diluição. Nestes casos, oferecemos frascos de 9 mL contendo caldos patenteados para utilização em vez do dispositivo de enriquecimento da Etapa 1. O uso de caldos enriquecidos em frascos de 9 mL não está incluído na certificação AOAC Research Institute (RI) *Performance Tested Methods*SM (PTMSM).

O Caldo EB melhorado (frasco de 9 mL) é mais seletivo para coliformes e *E. coli* na presença de bactérias do ácido láctico (BAL) ou *Enterobacteriaceae*, enquanto o Caldo Nutriente melhorado (frasco de 9 mL) proporciona uma melhor recuperação de bactérias aeróbias, coliformes e *E. coli*. A orientação para selecionar um caldo MicroSnap está resumida na Tabela 1.

Tabela 1. Guia de seleção do caldo MicroSnap Enhanced.

Necessidades de teste	Tipo de frasco
Total e Coliformes/ <i>E. coli</i>	Caldo de nutrientes melhorado
<i>Enterobacteriaceae</i> e Coliformes/ <i>E. coli</i>	Caldo EB melhorado
Apenas coliformes/ <i>E. coli</i> - flora de fundo reduzida	Caldo de nutrientes melhorado
Coliformes/ <i>E. coli</i> - flora de fundo elevada	Caldo EB melhorado



Utilizador previsto

O pessoal de laboratório com formação em práticas microbiológicas padrão está qualificado para utilizar os dispositivos MicroSnap Coliform e *E. coli*.

Aplicabilidade

O MicroSnap Coliform and *E. coli* é aplicável para a contagem de coliformes e *E. coli* em superfícies ambientais, amostras de produtos, água e outros líquidos filtráveis. O método foi validado através da certificação AOAC RI *PTM* para uma variedade de alimentos, incluindo carne, laticínios, marisco, vegetais e grupos de alimentos para bebidas. Para mais informações, consultar o certificado AOAC RI *PTM* 071302 em www.hygiena.com/documents.

Materiais necessários (não fornecidos)

- Luminómetro EnSURE Touch (Nº do produto ETOUCH)
- Incubadora de blocos secos (a $37 \pm 0,5$ °C) (Nº do produto INCUBATOR ou INCUBATOR2)
- Opções de blocos para incubadoras:
 - 35 poços para swabs para INCUBATOR2 (Nº do produto IB001)
 - 15 poços para frascos de 9 mL para INCUBATOR2 (Nº do produto IB002)
 - 12 poços para swabs para INCUBATOR (Nº do produto IB003)
 - 6 poços para frascos de 9 mL para INCUBATOR (Nº do produto IB004)

Materiais necessários para testar amostras de produtos (não fornecidos)

- Sacos de amostras
- Equipamento de homogeneização
- Pipetador e pontas para 1 mL
- Opções de diluente de amostras de produtos:
 - Água peptonada tamponada
 - Diluente de recuperação máxima
Nota: O diluente de recuperação máxima foi utilizado no estudo de validação *PTM* da AOAC RI.
 - Diluente de Butterfield
 - Água esterilizada

Conselhos importantes antes de iniciar o teste

- Para amostras que possam necessitar de diluição (por exemplo, soluções opacas; amostras que possam conter higienizadores, tensoativos ou outros compostos inibidores), utilizar o MicroSnap Enhanced EB Broth ou Nutrient Broth para enriquecimento (para mais informações, ver [Apêndice](#) e [diagramas](#)).
- As amostras do produto podem ser armazenadas antes da utilização a 2 a 8 °C até 2 dias, mas devem ser equilibradas à temperatura ambiente (20 a 25 °C) antes de testar as amostras com MicroSnap Coliform e *E. coli*.
- Os dispositivos ou frascos de enriquecimento (i.e., MicroSnap Coliform and *E. coli* Enrichment Devices, MicroSnap Enhanced EB Broth e MicroSnap Enhanced Nutrient Broth) e os dispositivos de deteção (i.e., MicroSnap Coliform Detection Devices e MicroSnap *E. coli* Detection Devices) devem ser equilibrados a 20 - 25 °C antes da utilização.
- Utilizar técnicas assépticas: ao colher amostras ou ao transferir amostras enriquecidas, não tocar com os dedos no swab ou no interior do dispositivo ou frasco de enriquecimento.



Procedimento de ensaio

Etapa 1: Enriquecimento

O procedimento de enriquecimento é descrito a seguir e também é mostrado nos [diagramas da Etapa 1](#).

1. Recolher e preparar a amostra, de acordo com o tipo de amostra indicado:
 - a. Amostras de superfície - Utilize o dispositivo de enriquecimento previamente umedecido para recolher amostras numa área quadrada de 10 x 10 cm (4 x 4 polegadas).

Conselhos importantes sobre a técnica de esfregaço:

 - i. Aplicar pressão suficiente para criar flexão na haste do esfregaço.
 - ii. Esfregue de forma cruzada na vertical, na horizontal e na diagonal em ambas as direcções.
 - iii. Rodar o swab enquanto se recolhe a amostra para maximizar a recolha de amostras na ponta da algodão
 - iv. Para superfícies irregulares, garantir que a técnica de esfregaço se mantém consistente para cada teste e esfrega uma área suficientemente grande para recolher uma amostra representativa.
 - b. Amostras líquidas-Transfira 1 mL de uma amostra de líquido ou água diretamente para o dispositivo de enriquecimento.
 - c. Amostras de produtos sólidos - Transferir 1 mL de uma suspensão adequada, por exemplo, homogenato de alimentos a 10% p/v, diretamente para o Dispositivo de Enriquecimento.
 - i. O homogenato alimentar deve ser preparado pesando 10 ou 50 g de matriz alimentar e adicionando-o a um saco de stomacher contendo 90 mL ou 450 mL de diluente, respetivamente.
 - ii. Para contaminação desconhecida da amostra, preparar e testar diluições em série 1:10 (ou seja, 10%, 1% e 0,1%).
 - iii. Se forem necessárias amostras replicadas, devem ser retirados mais 10 g ou 50 g da matriz a granel e a série de diluições deve ser repetida. A replicação pode ser conseguida retirando múltiplas alíquotas de 1 mL das diluições de 10%, 1% ou 0,1%, dependendo das UFCs obtidas.

Nota: Ao efetuar testes de comparação, os ensaios de amostras devem ser iniciados com uma diferença de 10 minutos entre si para que os resultados sejam comparáveis entre os métodos.
 - d. Voltar a colocar a zaragatoa no tubo da zaragatoa. O dispositivo deve ter o mesmo aspeto que tinha quando foi retirado do saco.
2. Ativar o Dispositivo de Enriquecimento segurando firmemente o tubo do swab e utilizando o polegar e o indicador para quebrar a Snap-Valve, dobrando o bulbo para a frente e para trás.
3. Separar a ampola e o tubo de esfregaço até que a ponta do esfregaço esteja acima do fluido e apertar a ampola para descarregar todo o meio para o tubo de esfregaço. Assegurar que a maior parte do caldo se encontra no fundo do tubo de esfregaço.
4. Voltar a fixar firmemente o swab no tubo de coleta para selar o dispositivo e agitar suavemente o tubo para misturar a amostra e o caldo.
5. Incubar a $37 \pm 0,5$ °C durante 6 horas \pm 10 minutos para resultados quantitativos (contagem) ou 8 - 24 horas para resultados qualitativos (ausência/presença).

Nota: Nos estudos de validação qualitativa AOAC RI *PTM*, as amostras foram incubadas durante 8 horas \pm 10 minutos.



Etapa 2: Detecção

O procedimento de deteção é descrito abaixo e também é mostrado em ([MicroSnap Enrichment Device](#) ou [MicroSnap Enhanced Broth Vials](#)).

Antes de iniciar o Passo 2, ligar o luminómetro. Se tiver programado a sua amostra MicroSnap no luminómetro, abra o ecrã de teste da amostra que pretende testar.

Não esquecer de equilibrar o dispositivo de deteção MicroSnap Coliform ou *E. coli* (MS2-COLIFORM ou MS2-ECOLI) à temperatura ambiente (10 minutos a 20-25 °C) antes de o utilizar.

1. Agitar o dispositivo de teste, batendo na palma da mão 5 vezes ou fazendo um movimento descendente forçado uma vez.

Nota: Esta operação é necessária para levar o líquido até ao fundo do tubo, o que facilitará a mistura da amostra enriquecida com o extrato no tubo.

2. Transferir assepticamente 0,1 mL (2 gotas) de amostra enriquecida para o Dispositivo de Detecção.

- a. Para os Dispositivos de Enriquecimento MicroSnap, utilizar a ponta conta-gotas incorporada como pipeta:

- i. Apertar e soltar o bulbo do Dispositivo de Enriquecimento para misturar e introduzir a amostra no bulbo.
- ii. Abrir assepticamente o dispositivo de enriquecimento e o dispositivo de deteção, torcendo e puxando para retirar os bulbos
- iii. Inserir a ponta do swab do Enrichment Device 3 cm (1 polegada) na parte superior do tubo do Detection Device e apertar suavemente a ampola do Enrichment Device para transferir 2 gotas da amostra enriquecida para o tubo.

Nota: É adicionada uma linha de enchimento ao tubo como referência. Volumes de transferência inconsistentes aumentam a variação dos resultados do teste.

- b. Para frascos de caldo MicroSnap:

- i. Retirar o frasco de caldo melhorado da incubadora e agitar ou agitar em vórtex durante 10 segundos para dispersar a amostra.
- ii. Destampar assepticamente o frasco e abrir o Dispositivo de Detecção, torcendo e puxando para retirar o bulbo.
- iii. Pipetar assepticamente 0,1 mL da amostra enriquecida diretamente para o tubo do Dispositivo de Detecção.

- c. Voltar a montar o Dispositivo de Enriquecimento no seu estado original ou voltar a tapar o frasco e devolver a amostra à incubadora para potencial novo teste.

Nota: Ao testar réplicas da mesma amostra enriquecida, todas as réplicas devem ser efetuadas com um intervalo de 10 minutos entre si para obter resultados comparáveis.



3. Ativar o Dispositivo de Detecção segurando firmemente o tubo e utilizando o polegar e o indicador para quebrar a Snap-Valve, dobrando o bulbo para a frente e para trás. Apertar o bulbo 3 vezes para libertar todo o líquido para o fundo do tubo.
4. Agitar suavemente durante 2 segundos para misturar.
5. Incubar o dispositivo de deteção durante $10 \pm 0,5$ minutos a $37 \pm 0,5$ °C.
6. Inserir imediatamente o dispositivo completo no luminómetro, fechar a tampa e, mantendo a unidade na vertical, pressione o botão para iniciar a medição.
7. Os luminómetros EnSURE Touch apresentam resultados em UFCs em 10 segundos.

Nota: As amostras MicroSnap podem ser programadas diretamente no luminómetro ou utilizando o software SureTrend®.

Informações adicionais

Testes adicionais

Se for encontrado um resultado positivo utilizando o Dispositivo de Detecção de Coliformes MicroSnap (MS2-COLIFORM), confirmar a presença ou ausência de *E. coli* na amostra repetindo o [Passo 2: Instruções de deteção](#) acima, utilizando outra alíquota da mesma amostra enriquecida e o Dispositivo de Detecção de *E. coli* MicroSnap (MS2-ECOLI). Se efetuar apenas testes de *E. coli*, deve ser considerado um teste de confirmação adicional, como a PCR no Hygiena BAX® System.

Limite potencial de deteção

O limite de deteção é o nível mais baixo de bactérias aeróbias viáveis que pode ser detectado acima de uma matriz alimentar de fundo quando o ensaio é realizado de forma correcta e eficiente.

Tabela 2. Gama Dinâmica Potencial (Limite de Detecção) para o Luminómetro EnSURE Touch.

Tipo de amostra	Intervalo de UFC* (Enriquecimento: 6 h ± 10 min)	Presença ou ausência de UFC (Enriquecimento: 8 ± 10 min)†
Superfície	10 - 10.000 CFU/swab	0 (ausência)
Líquido (1 mL)	10 - 10.000 CFU/mL	1 UFC (precaução)
Suspensão de sólido (10% p/v)	100 - 10.000 CFU/g	≥2 CFU (presença)

* Factores adicionais, tais como diluições, tempos de incubação e tipos de matriz, podem alterar os intervalos apresentados nesta tabela. Se a contaminação da amostra for superior aos intervalos indicados neste quadro, devem ser efetuadas diluições para que a contaminação se situe dentro do intervalo detectável do luminómetro. Por exemplo:

-A suspensão a 1% será de 1.000 - 100.000 UFC para uma incubação de 6 horas.

-A suspensão de 0,1% será de 10.000 - 1.000.000 UFC para uma incubação de 6 horas.

† A incubação para resultados de presença/ausência pode ser prolongada até 24 horas. **Nota:** O tempo de enriquecimento foi de 8 horas ± 10 minutos para os estudos de validação qualitativa AOAC RI PTM.

Interpretação dos resultados

Os resultados dos luminómetros EnSURE Touch são apresentados em UFCs, fornecendo resultados qualitativos (presença/ausência) e quantitativos (UFC/g ou UFC/mL).

Quando várias diluições são preparadas e testadas para amostras com contaminação desconhecida, o UFC/g ou UFC/mL é calculada multiplicando o resultado da UFC pelo fator de diluição correspondente. O software EnSURE Touch efetua esta conversão, utilizando dados gerados a partir dos estudos de validação AOAC RI PTM, bem como testes internos adicionais.

**Certificação de métodos testados de desempenho AOAC RI**

A detecção de coliformes e *E. coli* utilizando o sistema MicroSnap Coliform and *E. coli* (ou seja, o dispositivo de enriquecimento MicroSnap Coliform and *E. coli* com o dispositivo de detecção MicroSnap Coliform ou o dispositivo de detecção MicroSnap *E. coli*) e os luminómetros Hygiena obteve a certificação AOAC RI *PTM* (Licença n.º 071302) do Instituto de Investigação AOAC.



Os alimentos testados no âmbito da validação AOAC RI *PTM* estão listados no Quadro 3.

Tabela 3. Matrizes Validadas com MicroSnap Coliform e *E. coli* em Luminómetros Hygiena.

Quantitativo (Enriquecimento: 6 horas ± 10 minutos)		Qualitativa (Enriquecimento: 8 horas ± 10 minutos)	
Coliformes	<i>E. coli</i>	Coliformes	<i>E. coli</i>
Carne de vaca crua moída	Carne de vaca crua moída	Carne de vaca crua moída	Carne de vaca crua moída
Sanduíche BLT	Sanduíche BLT	—	Sanduíche BLT
Bacalhau cru	Bacalhau cru	Bacalhau cru	Bacalhau cru
Frango cozinhado	Frango cozinhado	Frango cozinhado	Frango cozinhado
Alface	Alface	Alface	—
Leite	Leite	Leite	Leite
Galinha crua	Galinha crua	Galinha crua	Galinha crua
Presunto RTE	Presunto RTE	—	—
Camarão cru	Camarão cru	Camarão cru	Camarão cru
Água engarrafada	Água engarrafada	Água engarrafada	Água engarrafada

Validações adicionais da Hygiena

Para além das matrizes incluídas nos estudos de certificação AOAC RI *PTM* (Quadro 3), os laboratórios Hygiena continuam a testar outras matrizes, como o leite achocolatado e o leite pasteurizado. O teste ótimo para algumas matrizes envolveu a utilização do Caldo EB melhorado ou dos frascos de Caldo Nutriente melhorado (9 mL), que não foram incluídos na certificação AOAC RI *PTM*. Para testes qualitativos, alguns utilizadores validaram tempos de incubação prolongados (até 24 h), o que não está incluído na certificação AOAC RI *PTM*.

Contactar o apoio técnico em www.hygiena.com/support para obter informações e assistência com matrizes adicionais.

Limitações

É importante que as amostras sejam levadas à temperatura ambiente (20 a 25 °C) antes de serem utilizadas nos dispositivos MicroSnap. As amostras que não forem levadas à temperatura ambiente antes da incubação (por exemplo, retiradas diretamente da refrigeração a 2-8 °C) apresentarão uma sub-deteção devido ao tempo necessário para atingir a temperatura de incubação.

É importante que todos os meios ou diluentes utilizados com MicroSnap Coliform e *E. coli* sejam estéreis. Os inibidores nos meios e diluentes são a principal razão para a maioria das deteções sem sucesso. A Hygiena recomenda os diluentes listados na secção [Materiais Necessários](#).



Os perfis enzimáticos de alguns coliformes, como as estirpes de *Hafnia alvei*, são diferentes da maioria dos outros coliformes, pelo que estas estirpes não serão detectadas e enumeradas por métodos de deteção bioquímicos e cromogénicos, como os utilizados nos testes MicroSnap Coliform.

Os organismos com perfis enzimáticos semelhantes, como a *Shigella sonnei*, não podem ser diferenciados da *E. coli* por métodos de deteção bioquímicos ou cromogénicos, como os utilizados nos testes MicroSnap *E. coli*.

Para além disso, os perfis enzimáticos de algumas *E. coli* produtoras de toxina Shiga (STEC), tais como *E. coli* O157:H7, significam que serão detectadas e enumeradas pelo teste MicroSnap Coliformes, mas não pelo teste MicroSnap *E. coli*.

Para mais informações, consulte [Precauções e responsabilidade do utilizador](#) ou contacte-nos.

Resolução de problemas

A Tabela 4 fornece orientação sobre como superar alguns efeitos de amostra comumente vistos. Para obter apoio adicional sobre protocolos ou matrizes, contacte-nos através do endereço www.hygiena.com/support.

Tabela 4. Resolução de problemas.

Observação	Causa possível	Ação recomendada
UFC elevados com algumas matrizes, tais como folhas verdes e produtos lácteos fermentados.	Alguns tipos de amostras contêm naturalmente níveis elevados de nucleótidos que podem aumentar os resultados de UFC.	Contacte-nos para obter assistência na personalização da conversão de RLU para UFC e dos níveis de limiar do instrumento para a sua matriz de amostras.
UFC's baixos com matrizes de amostras espessas, opacas ou escuras, como leite ou chocolate não diluídos.	A interferência com a deteção de luz pelo luminómetro pode ser causada por um efeito de branqueamento da matriz da amostra.	Utilizar um dos caldos MicroSnap Enhanced Broths em frascos de 9 mL para enriquecimento. Ver Apêndice para mais informações.

Calibração e controlos

É aconselhável efetuar controlos positivos e negativos de acordo com as Boas Práticas de Laboratório. A Hygiena oferece o seguinte dispositivo de verificação da calibração: Dispositivo de Verificação de Calibração CalCheck LED (Nº do Produto CAL).

Armazenamento e prazo de validade

- Conservar entre 2 e 8°C (36 e 46 °F).
- Não utilizar após o prazo de validade indicado no rótulo.

Eliminação

Desinfetar antes de eliminar. Os dispositivos MicroSnap podem ser desinfectados por autoclavagem ou branqueamento (mergulhar os dispositivos não selados em lixívia a 20% durante 1 hora). Depois, podem ser colocados no lixo. Em alternativa, os dispositivos MicroSnap podem ser eliminados numa instalação de eliminação de resíduos de risco biológico.



Segurança e precauções

- Os componentes do dispositivo MicroSnap não representam qualquer risco para a saúde quando utilizados corretamente. Os dispositivos usados que confirmam resultados positivos podem constituir um risco biológico e devem ser eliminados de forma segura, em conformidade com as Boas Práticas de Laboratório e os Regulamentos de Saúde e Segurança (ver instruções de eliminação acima).
- Evitar a exposição prolongada à luz.
- Os dispositivos foram concebidos para uma única utilização. Não reutilizar.

Precaução e responsabilidade do utilizador

- Os dispositivos MicroSnap não foram testados com todos os produtos alimentares possíveis, processos alimentares, protocolos de teste ou com todas as estirpes possíveis da família Coliform.
- Apenas para utilização *in vitro*. Não se destina a ser utilizado em procedimentos de diagnóstico.
- Tal como acontece com qualquer teste baseado num meio de cultura, os resultados do MicroSnap não constituem uma garantia de qualidade do produto.
- Nenhum meio de cultura recuperará a mesma estirpe ou enumerará uma determinada estirpe da mesma forma que outro meio. Outros factores externos, como o método de amostragem, o protocolo de teste e o manuseamento, podem influenciar a recuperação.
- A coleta de amostras deve ser efetuada de forma asséptica para evitar a contaminação cruzada.
- É da responsabilidade do utilizador, ao selecionar um método de ensaio, avaliar um número suficiente de amostras.
- Verificar a temperatura e o tempo de incubação adequados para a aplicação do teste.
- O tempo de incubação será de 6 horas \pm 10 minutos para resultados quantitativos (enumeração) ou de 8 a 24 horas para resultados qualitativos (presença/ausência), tal como especificado nas instruções acima, a menos que a equipa de I&D da Hygiena tenha dado instruções em contrário para aplicações personalizadas que exijam tempos (ou temperaturas) de incubação diferentes.

Nota: Nos estudos de validação qualitativa AOAC RI *PTM*, as amostras foram incubadas durante 8 horas \pm 10 minutos.

- Assegurar uma diluição adequada da amostra para que as amostras possam ser lidas dentro da gama dinâmica do luminómetro.
- Ao testar várias diluições em série, todas as diluições devem ser preparadas e testadas com uma diferença de 10 minutos entre si para obter resultados lineares.
- Ao testar réplicas da mesma amostra enriquecida, todas as réplicas devem ser efetuadas com uma diferença de 10 minutos entre si para obter resultados comparáveis.
- Ao efetuar testes de comparação, os ensaios de amostras devem ser iniciados com uma diferença de 10 minutos entre si para que os resultados sejam comparáveis entre os métodos.



Responsabilidade da Hygiena

Tal como acontece com qualquer teste baseado em meios de cultura, os resultados do MicroSnap Coliform e *E. coli* não constituem uma garantia de qualidade dos alimentos, bebidas ou processos que são testados com estes dispositivos. A Hygiena não será responsável perante o utilizador ou outros por qualquer perda ou dano, direto ou indireto, incidental ou consequente, resultante da utilização destes dispositivos. Se provar que este produto é defeituoso, a única obrigação da Hygiena será substituir o produto ou, se assim o entender, reembolsar o preço de compra. Notifique imediatamente a Hygiena no prazo de 5 dias após a descoberta de qualquer suspeita de defeito e devolva o produto à Hygiena; contate o Serviço de Apoio ao Cliente para obter um Número de Autorização de Devolução de Mercadorias.

Informações de contacto

Para obter mais informações, visite www.hygiena.com/contact. Para obter suporte técnico, visite www.hygiena.com/support.

Performance Testing MethodsSM é uma marca de serviço da AOAC International.



Apêndice: Enriquecimento de matrizes difíceis com MicroSnap Enhanced EB Broth ou MicroSnap Enhanced Nutrient Broth

Os caldos MicroSnap Enhanced Broths contêm 9 mL de um meio líquido único concebido para o crescimento de microrganismos aeróbios e facultativos, aumentando simultaneamente a produção de biomarcadores e enzimas específicas de diagnóstico de coliformes e *E. coli* e reduzindo as interferências nas amostras. Os caldos destinam-se a aplicações que requerem a detecção de bactérias em amostras de alimentos difíceis, tais como suspensões líquidas opacas (ver [Quadro 1](#)).

O MicroSnap Enhanced Nutrient Broth é um meio pronto a usar compatível com os dispositivos de detecção MicroSnap Total (MS2-TOTAL), MicroSnap Coliform (MS2-COLIFORM) e MicroSnap *E. coli* (MS2-ECOLI). O MicroSnap Enhanced EB Broth é um meio pronto a usar compatível com os dispositivos de detecção MicroSnap EB (MS2-EB), MicroSnap Coliform (MS2-COLIFORM) e MicroSnap *E. coli* (MS2-ECOLI). As instruções neste folheto destinam-se ao enriquecimento de leite, soluções opacas e outras amostras de alimentos difíceis para testes de coliformes e *E. coli*. Para obter ajuda no desenvolvimento de um protocolo para a sua matriz, incluindo o ajuste das temperaturas de incubação do enriquecimento, contacte a Hygiena para obter orientação.

Conselhos importantes antes de iniciar o teste

- A utilização dos caldos melhorados em frascos de 9 mL não está incluída na certificação AOAC RI PTM.
- Inspeccionar visualmente o líquido no frasco para injetáveis antes da utilização. O líquido deve ser límpido e de cor palha clara, não turvo.
- Utilizar um marcador permanente para identificar a amostra no rótulo do frasco.

Etapa 1: Enriquecimento com caldo MicroSnap Enhanced

O procedimento de enriquecimento é descrito a seguir e também é mostrado nos [diagramas da Etapa 1](#).

1. Recolher e preparar a amostra utilizando técnicas assépticas:
 - a. Amostras líquidas - Adicionar 1 mL de amostra diretamente ao frasco de Caldo melhorado.
 - b. Amostras sólidas-Transfira 1 mL de uma diluição adequada da amostra em diluente estéril diretamente para o frasco de Caldo reforçado.
2. Voltar a colocar e apertar a tampa.
3. Agitar ou agitar em vórtex durante 10 segundos para misturar o conteúdo.
4. Incubar o frasco numa incubadora Hygiena Digital Dry Block Incubator durante 6 ou 8 horas, dependendo do tipo de amostra e da sensibilidade necessária (Quadro 5).

Tabela 5. Tempo de incubação, temperatura e gama dinâmica potencial.

Tempo de incubação*	Intervalo de UFC	Caldo de nutrientes melhorado		Caldo EB melhorado
		Leite	Alimentos líquidos ou sólidos	Leite, alimentos líquidos ou sólidos
		32 ± 0.5 °C	30 ± 0.5 °C	37 ± 0.5 °C
6 h ± 10 min	50 - Registro 6	Enumeração	Enumeração	Enumeração
8 h ± 10 min [†]	<5 - 5,000	Presença/ausência	Presença/ausência	Presença/ausência

*A enumeração dos períodos de incubação fora dos tempos definidos não foi validada.

[†]A incubação para resultados de presença/ausência pode ser prolongada até 24 horas.

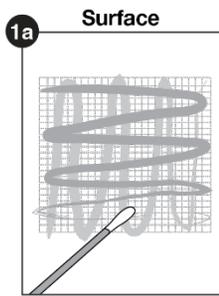
Etapa 2: Deteção

Seguir [as instruções de deteção](#) descritas acima.

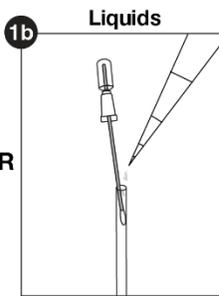


Dispositivos de Enriquecimento e Detecção MicroSnap® para Coliformes e *E. coli*

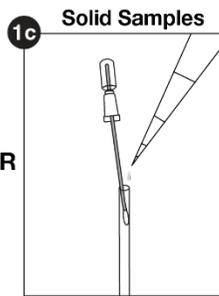
Etapa 1: Enriquecimento da amostra



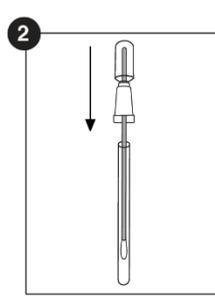
1a. Superfície: Esfregar uma área de 10 x 10 cm com um dispositivo de enriquecimento à temperatura ambiente* (RT).



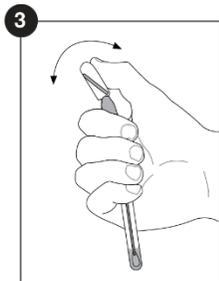
1b. Líquidos: Adicionar 1 mL de alimento líquido, bebida ou água diretamente ao RT Enrichment Device.



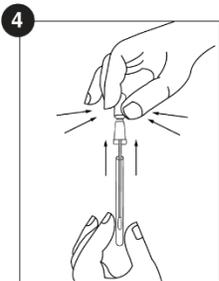
1c. Amostras sólidas: Adicionar 1 mL de suspensão a 10% p/v de amostra sólida diretamente ao RT Enrichment Device.



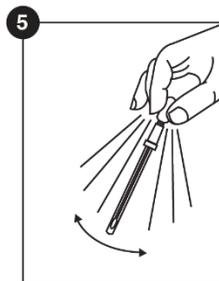
2. Voltar a inserir o bulbo da Snap-Valve no tubo do esfregaço.



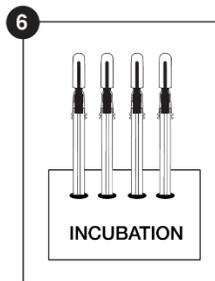
3. Ativar o dispositivo. Dobrar a bulbo, quebrando a válvula de pressão.



4. Levantar o bulbo (1 - 2 polegadas) e apertar para libertar o líquido para o fundo do tubo.



5. Voltar a colocar a ampola no tubo e agitar suavemente o tubo para misturar a amostra no líquido.



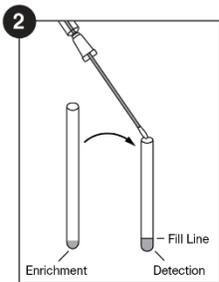
6. Incubar a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 6 h \pm 10 min (quantitativo) ou 8 h \pm 10 min (qualitativo).



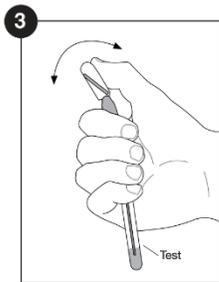
Etapa 2: Detecção ou medição



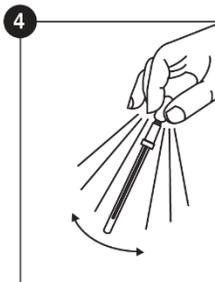
1. Equilibrar o dispositivo de detecção à temperatura ambiente. Agitar para fazer descer o líquido para o fundo.



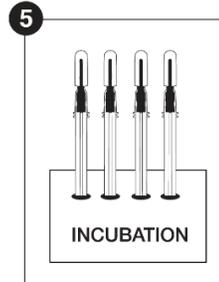
2. Transferir assepticamente 2 gotas (0,1 mL) de amostra enriquecida do Dispositivo de Enriquecimento para o Dispositivo de Detecção.



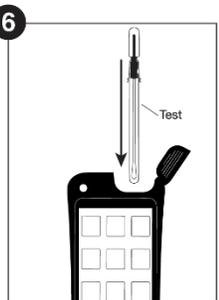
3. Ativar o Dispositivo de Detecção (Teste) quebrando a Válvula de Encaixe. Apertar o bulbo para libertar o líquido para o tubo.



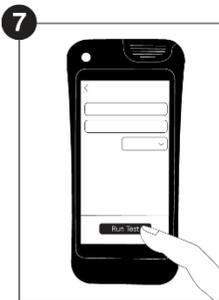
4. Agitar suavemente o tubo para misturar a amostra no líquido.



5. Incubar o dispositivo de detecção durante $10 \pm 0,2$ minutos a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$.



6. Aplicação EnSURE® Touch, MicroSnap®: Se a amostra estiver programada, selecionar a amostra; caso contrário, selecionar **Teste Rápido**. Em seguida, apertar **Executar teste**.



7. O EnSURE Touch guarda automaticamente os resultados. Registrar e sincronizar o luminómetro sem fios com o software SureTrend® para para ver relatórios e conjuntos de dados.

* Temperatura ambiente = 20 a 25 °C.

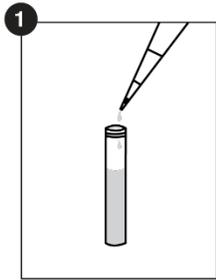
† Se for positivo para coliformes, a presença de *E. coli* pode ser verificada repetindo o passo 2 utilizando outra alíquota da mesma amostra enriquecida e um dispositivo de detecção de *E. coli*.



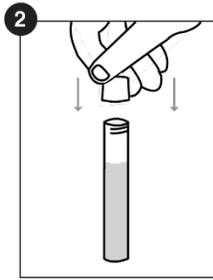
MicroSnap® Enhanced Broth Vial e Dispositivo de Detecção MicroSnap

Nota: A utilização do caldo de nutrientes melhorado não está incluída na certificação AOAC RI *PTM*.

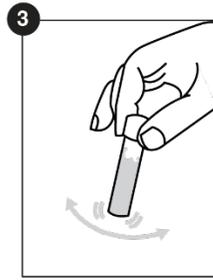
Etapa 1: Enriquecimento da amostra



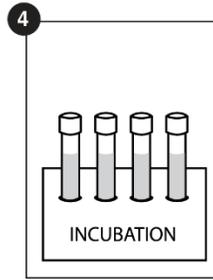
1. Equilibrar a amostra e o caldo a 20 - 25 °C. Adicionar 1 mL da diluição adequada das amostras ao caldo melhorado.



2. Voltar a colocar e apertar a tampa.

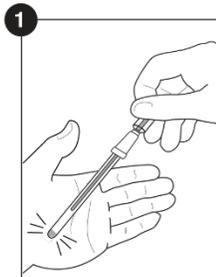


3. Agitar ou agitar em vórtice durante 10 segundos.

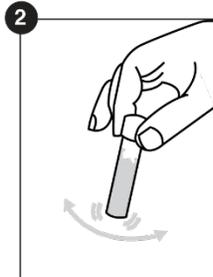


4. Incubar no tempo e temperatura adequados para o seu tipo de amostra. Consultar o Quadro 4 para mais informações

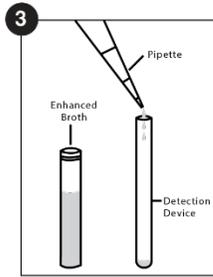
Etapa 2: Detecção ou medição



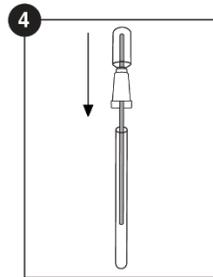
1. Equilibrar o Dispositivo de Detecção à temperatura ambiente. Agitar para fazer descer o líquido para o fundo.



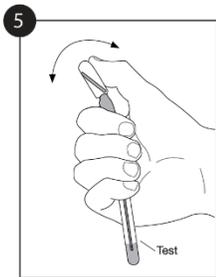
2. Agitar ou agitar em vórtice durante 10 segundos.



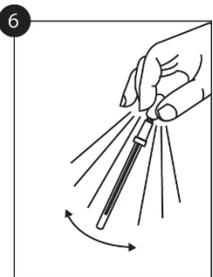
3. Transferir assepticamente 0,1 mL de amostra enriquecida para o Dispositivo de Detecção.



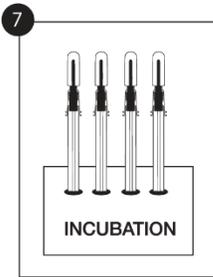
4. Voltar a montar o dispositivo de deteção no seu estado original.



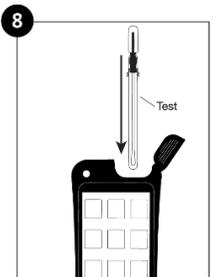
5. Ativar o dispositivo partindo a Snap-Valve. Apertar o bulbo para libertar o líquido para o tubo.



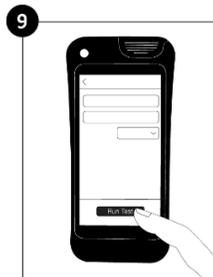
6. Agitar suavemente o tubo para misturar a amostra no líquido.



7. Incubar o dispositivo de deteção durante 10 ± 0,2 minutos a 37 ± 0,5 °C.



8. Insira o dispositivo no EnSURE® Touch. No aplicativo MicroSnap®: Se a amostra estiver programada, selecionar amostra; caso contrário, selecionar **Teste Rápido**. Em seguida, pressione **Executar teste**.



9. O EnSURE Touch guarda automaticamente os resultados. Registrar e sincronizar o luminómetro sem fios com o software SureTrend® para ver relatórios e conjuntos de dados.