



## 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*<sup>SM</sup> (PTM<sup>SM</sup>).

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](http://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) 1 UFC (precaução) ≥2 CFU (presença)
Líquido (1 mL)	10 - 10.000 CFU/mL	
Suspensão de sólido (10% p/v)	100 - 10.000 CFU/g	

\* 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](http://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 detecção 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 detecção 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.hygienea.com/support](http://www.hygienea.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 detecção 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 <a href="#">Apêndice</a> para mais informações.

## Calibração e controlos

É aconselhável efetuar controlos positivos e negativos de acordo com as Boas Práticas de Laboratório. A Hygienea 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](http://www.hygiena.com/contact). Para obter suporte técnico, visite [www.hygiena.com/support](http://www.hygiena.com/support).

Performance Testing Methods<sup>SM</sup> 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 <sup>†</sup>	<5 - 5,000	Presença/ausência	Presença/ausência	Presença/ausência

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

<sup>†</sup>A incubação para resultados de presença/ausência pode ser prolongada até 24 horas.

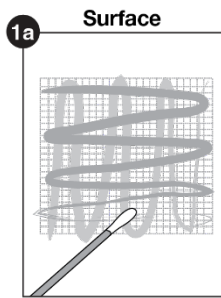
### Etapa 2: Deteção

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

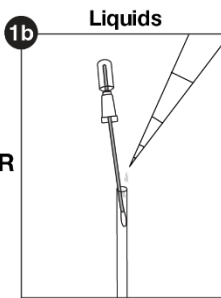


## Dispositivos de Enriquecimento e Detecção MicroSnap® para Coliformes e *E. coli*

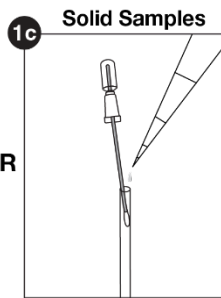
### Etapa 1: Enriquecimento da amostra



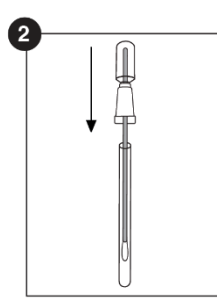
1a. Superfície: Esfregar uma área de 10 x 10 cm com um dispositivo de enriquecimento à temperatura ambiente\* (RT).



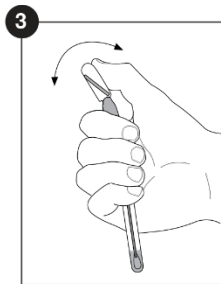
1b. Líquidos: Adicionar 1 mL de alimento líquido, bebida ou água diretamente ao RT Enrichment Device.



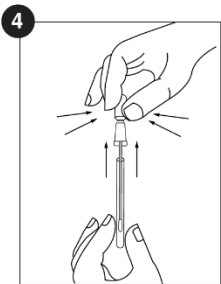
1c. Amostras sólidas: Adicionar 1 mL de suspensão a 10% p/v de amostra sólida diretamente ao RT Enrichment Device.



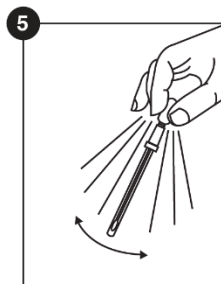
2. Voltar a inserir o bulbo da Snap-Valve no tubo do esfregaço.



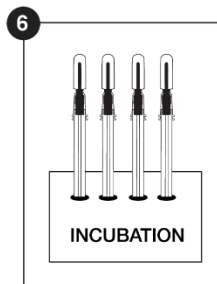
3. Ativar o dispositivo. Dobrar a bulbo, quebrando a válvula de pressão.



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



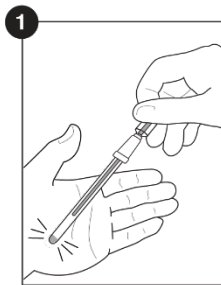
5. Voltar a colocar a ampola no tubo e agitar suavemente o tubo para misturar a amostra no líquido.



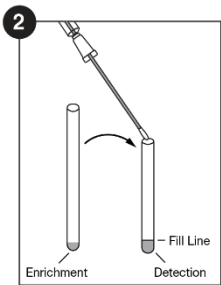
6. Incubar a  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$  durante 6 h  $\pm$  10 min (quantitativo) ou 8 h  $\pm$  10 min (qualitativo).



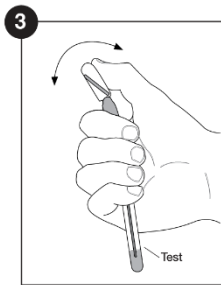
### Etapa 2: Detecção ou medição



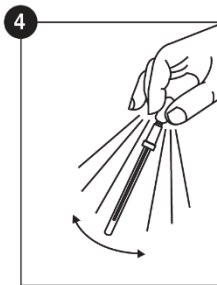
1. Equilibrar o dispositivo de detecção à temperatura ambiente. Agitar para fazer descer o líquido para o fundo.



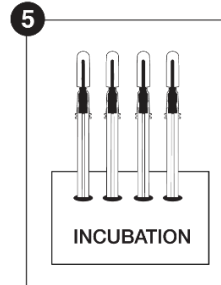
2. Transferir assepticamente 2 gotas (0,1 mL) de amostra enriquecida do Dispositivo de Enriquecimento para o Dispositivo de Detecção.



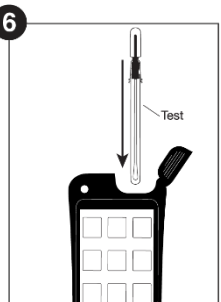
3. Ativar o Dispositivo de Detecção (Teste) quebrando a Válvula de Encaixe. Apertar o bulbo para libertar o líquido para o tubo.



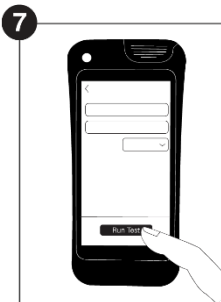
4. Agitar suavemente o tubo para misturar a amostra no líquido.



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.

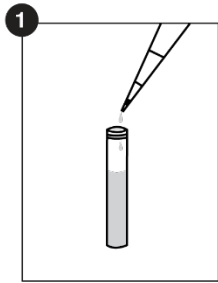
† Se for positivo para coliformes, a presença de *E. coli* pode ser verificada repetindo o passo 2 utilizando outra alíquota da mesma amostra enriquecida e um dispositivo de detecção de *E. coli*.



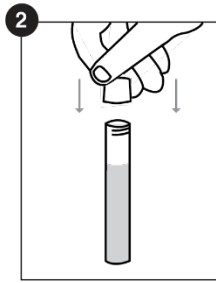
## MicroSnap® Enhanced Broth Vial e Dispositivo de Detecção MicroSnap

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

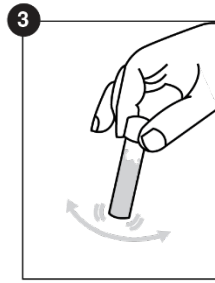
### Etapa 1: Enriquecimento da amostra



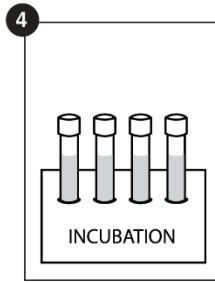
1. Equilibrar a amostra e o caldo a 20 - 25 °C. Adicionar 1 mL da diluição adequada das amostras ao caldo melhorado.



2. Voltar a colocar e apertar a tampa.

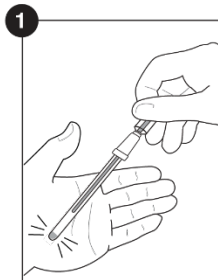


3. Agitar ou agitar em vórtice durante 10 segundos.

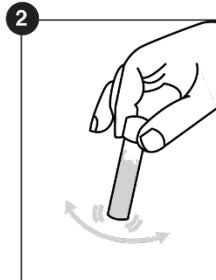


4. Incubar no tempo e temperatura adequados para o seu tipo de amostra. Consultar o Quadro 4 para mais informações

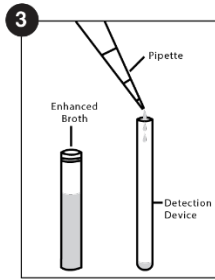
### Etapa 2: Detecção ou medição



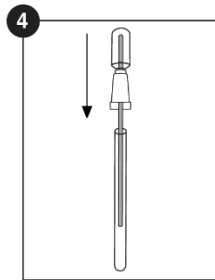
1. Equilibrar o Dispositivo de Detecção à temperatura ambiente. Agitar para fazer descer o líquido para o fundo.



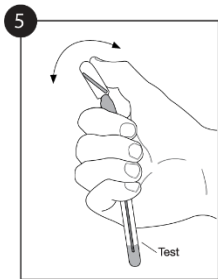
2. Agitar ou agitar em vórtice durante 10 segundos.



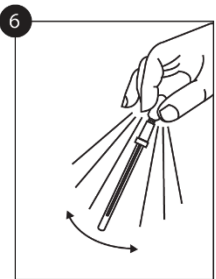
3. Transferir assepticamente 0,1 mL de amostra enriquecida para o Dispositivo de Detecção.



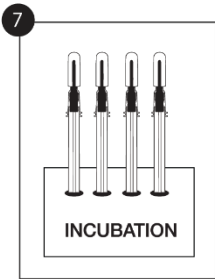
4. Voltar a montar o dispositivo de deteção no seu estado original.



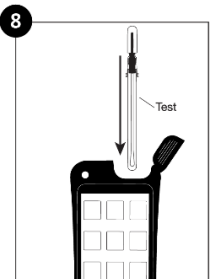
5. Ativar o dispositivo partindo a Snap-Valve. Apertar o bulbo para libertar o líquido para o tubo.



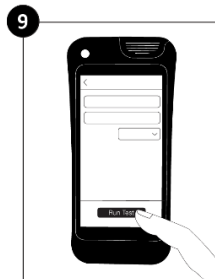
6. Agitar suavemente o tubo para misturar a amostra no líquido.



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.