



MicroSnap[®] EB (*Enterobacteriaceae*)

Para usar:

Opções de enriquecimento

- Nº do produto MS1-EB (dispositivo de enriquecimento MicroSnap[®] EB)
- Nº do produto MS1-EB-BROTH-9ML (caldo EB aprimorado MicroSnap em frasco de 9 mL)

Deteção

- Nº do produto MS2-EB (dispositivo de deteção de EB MicroSnap[®])

Introdução

Descrição e uso pretendido

O MicroSnap[®] EB (*Enterobacteriaceae*) é um teste bioluminogênico rápido para a deteção e enumeração de bactérias *Enterobacteriaceae* em uma amostra e fornece resultados em 6 a 8 horas. O MicroSnap EB consiste em um Dispositivo de Enriquecimento que contém meios de crescimento patenteados e um Dispositivo de Deteção que contém reagentes bioluminogênicos nos quais os biomarcadores produzidos pelas bactérias são medidos por meio de um luminômetro portátil da Hygiena[®].

O procedimento de teste em duas etapas requer um curto período de incubação seguido de uma etapa de deteção. Quanto maior for o número de bactérias na amostra, maior será a concentração do biomarcador e maior será a emissão de luz. Uma alíquota da amostra é transferida para o Dispositivo de Deteção, ativada, misturada e medida em um luminômetro. A saída de luz é diretamente proporcional à concentração de bactérias presentes.

Algumas matrizes, como suspensões líquidas opacas ou amostras com pH extremo, podem exigir diluição (consulte a seção [Dicas importantes](#)). Nesses casos, oferecemos frascos de 9 mL contendo o caldo MicroSnap Enhanced EB Broth patentado para uso em vez do dispositivo de enriquecimento.

Usuário pretendido

A equipe de laboratório treinada em práticas microbiológicas padrão está qualificada para usar os dispositivos MicroSnap EB.

Aplicabilidade

O MicroSnap EB pode ser usado para a enumeração de *Enterobacteriaceae* em superfícies ambientais, amostras de produtos, água e outros líquidos filtráveis. Se desejado, os dispositivos MicroSnap EB também podem fornecer resultados qualitativos (ausência/presença) para as mesmas matrizes.

Materiais necessários (não fornecidos)

- Luminômetro EnSURE[®] Touch (Nº do produto ETOUCH)
- Incubadora de blocos secos (a 37 ± 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 o teste de amostras de produtos (não fornecidos)

- Sacos de amostra
- Equipamento de homogeneização
- Pipetador e ponteiras para 1 mL
- Opções de diluentes de amostras de produtos:
 - Água peptonada tamponada
 - Diluente de recuperação máxima
 - Diluente de Butterfield
 - Água esterilizada

Conselhos importantes antes de iniciar o teste

- Para amostras que possam exigir diluição (por exemplo, soluções opacas; amostras que possam conter higienizadores, tensoactivos ou outros compostos inibidores), utilizar o MicroSnap Enhanced EB Broth para enriquecimento (para mais informações, consulte o [Apêndice](#) e [os diagramas](#)).
- As amostras de produtos podem ser armazenadas antes do uso entre 2 e 8 °C por até 2 dias, mas devem ser equilibradas à temperatura ambiente (20 a 25 °C) antes de testar as amostras com o MicroSnap EB.
- Os dispositivos de enriquecimento MicroSnap EB, os frascos de caldo MicroSnap Enhanced EB e os dispositivos de detecção MicroSnap EB devem ser equilibrados à temperatura ambiente antes do uso.
- Utilizar técnicas assépticas: ao coletar amostras ou transferir amostras enriquecidas, não toque o swab ou o interior do dispositivo ou frasco de enriquecimento com os dedos.



Procedimento de teste

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 esfregação:

 - i. Aplicar pressão suficiente para criar flexão na haste do esfregação.
 - 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 esfregação 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 esfregação até que a ponta do esfregação esteja acima do fluido e apertar a ampola para descarregar todo o meio para o tubo de esfregação. Assegurar que a maior parte do caldo se encontra no fundo do tubo de esfregação.
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.
1. Incubar a $37 \pm 0,5$ °C por 6 horas \pm 10 minutos ou 7 horas \pm 10 minutos para resultados quantitativos (enumeração) ou 8 - 24 horas para resultados qualitativos (ausência/presença) (consulte a Tabela 1).



Etapa 2: Detecção

O procedimento de detecção está descrito abaixo e também é mostrado em diagramas ([MicroSnap Enrichment Device](#) ou [MicroSnap Enhanced EB Broth Vial](#)).

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.

Lembre-se de equilibrar o dispositivo de detecção MicroSnap EB à temperatura ambiente (10 minutos a 20 a 25 °C) antes do uso.

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 detecção, 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. Insira imediatamente o dispositivo inteiro no luminômetro, feche a tampa e, mantendo a unidade na posição vertical, pressione o botão para iniciar a medição.
6. Os luminômetros EnSURE Touch apresentam resultados em UFCs em 10 segundos.

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

Informações adicionais

Limite potencial de detecção

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

Tabela 1. Gama Dinâmica Potencial (Limite de Detecção) para o Luminómetro EnSURE Touch.

Tipo de amostra	Intervalo de UFC*		Presença ou ausência de UFC (Enriquecimento: 8 h ± 10 min) [†]
	Enriquecimento: 6 h ± 10 min	Enriquecimento: 7 h ± 10 min	
Superfície	10 - 200.000 UFC/swab	10 - 10.000 CFU/swab	0 (ausência) 1 UFC (cuidado) ≥2 CFU (presença)
Líquido (1 mL)	10 - 350.000 CFU/mL	10 - 10.000 CFU/mL	
Suspensão de sólidos (10% p/v)	100 - 3.500.000 CFU/g	100 - 50.000 CFU/g	

* Fatores adicionais, como diluições, tempos de incubação e tipos de matriz, podem alterar os intervalos mostrados na Tabela 1. 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 de 1% será de 1.000 a 500.000 UFCs para uma incubação de 7 horas.
- A suspensão de 0,1% será de 10.000 a 5.000.000 UFC para uma incubação de 7 horas.

† A incubação para resultados de presença/ausência pode ser estendida para até 24 horas.

Interpretação dos resultados

Os resultados dos luminômetros EnSURE Touch são mostrados 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, a UFC/g ou UFC/mL é calculada multiplicando-se o resultado da UFC pelo fator de diluição correspondente. O luminómetro EnSURE Touch software faz essa conversão, usando os dados gerados pelos estudos de validação da AOAC e testes internos.

Resolução de problemas

A Tabela 2 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 2. Solução de problemas

Observação	Possível causa	Ação recomendada
UFCs elevadas com algumas matrizes, tais como folhas verdes.	Alguns tipos de amostras contêm naturalmente níveis elevados de nucleotídeos que podem aumentar os resultados de UFC.	Contacte-nos para obter assistência na personalização da conversão de RLU para UFC e os níveis de limiar do instrumento para a matriz de amostras.
incaracteristicamente UFC's baixas com matrizes de amostras espessas, opacas ou escuras, como leite ou chocolate não diluídos.	A interferência com a detecção de luz pelo luminômetro pode ser causada por um efeito de branqueamento da matriz da amostra.	Use o caldo MicroSnap Enhanced EB Broth em frascos de 9 mL para enriquecimento. Veja o Apêndice para obter detalhes.

Calibração e controles

É aconselhável executar controles positivos e negativos de acordo com as Boas Práticas de Laboratório. A Hygiena oferece os seguintes dispositivos de verificação da calibração: Dispositivo de Verificação de Calibração CalCheck LED (N.º do Produto CAL).

Armazenamento e prazo de validade

- Armazene de 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).
- Não use dispositivos MicroSnap para diagnóstico de doenças em humanos e animais.
- Como em qualquer teste baseado em meio de cultura, os resultados do MicroSnap não constituem uma garantia de qualidade do produto.
- 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 possíveis produtos alimentícios, processos alimentícios, protocolos de teste ou com todas as possíveis cepas de microrganismos.
- • 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 estimativa de *Enterobacteriaceae* não pode ser usada como medida substituta para a presença ou ausência de espécies de *Salmonellae*. Para investigações da presença de *Salmonellae*, um teste de *Salmonellae* com método padrão deve ser realizado em alimentos ou superfícies ambientais.
- A colheita de amostras deve ser efectuada de forma asséptica para evitar a contaminação cruzada.
- É da responsabilidade do utilizador, ao seleccionar um método de ensaio, avaliar um número suficiente de amostras.
- Verifique a temperatura e o tempo de incubação adequados para a aplicação do teste.
- O tempo de incubação será de 6 horas \pm 10 minutos ou 7 horas \pm 10 minutos para resultados quantitativos (enumeração) ou 8 - 24 horas para resultados qualitativos (presença/ausência), conforme especificado nas instruções acima, a menos que a equipe de P&D da Hygiena tenha orientado de outra forma para aplicações personalizadas que exijam tempos (ou temperaturas) de incubação diferentes.
- • 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 efectuadas 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 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 EB não constituem garantia de qualidade de alimentos, bebidas ou processos testados com esses 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.hygienea.com/contact. Para obter suporte técnico, visite www.hygienea.com/support.



Apêndice: Enriquecimento de matrizes desafiadoras com caldo MicroSnap Enhanced EB

O caldo MicroSnap Enhanced EB contém 9 mL de um meio líquido exclusivo projetado para cultivar microrganismos aeróbicos e facultativos e, ao mesmo tempo, aumentar a produção de biomarcadores e enzimas específicas para o diagnóstico de *Enterobacteriaceae* e reduzir as interferências nas amostras. O caldo é destinado principalmente a aplicações que exigem a detecção de bactérias em amostras desafiadoras, como suspensões líquidas opacas.

O caldo MicroSnap Enhanced EB é um meio pronto para uso compatível com os três dispositivos de detecção a seguir: Dispositivos de detecção MicroSnap EB (MS2-EB), MicroSnap Coliformes (MS2-COLIFORM) e MicroSnap *E. coli* (MS2-ECOLI). As instruções deste folheto servem para enriquecer soluções opacas (por exemplo, leite) e outras amostras desafiadoras de alimentos (por exemplo, especiarias) para detecção de *Enterobacteriaceae*. Para obter ajuda no desenvolvimento de um protocolo para a sua matriz, incluindo o ajuste das temperaturas de incubação de enriquecimento, entre em contato com a Hygiena para obter orientação.

Conselhos importantes antes de iniciar o teste

- Inspecionar visualmente o líquido no frasco para injectáveis 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 de nutrientes aprimorado MicroSnap

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 - Adicione 1 mL de amostra diretamente ao frasco de caldo EB aprimorado.
 - b. Amostras sólidas - Transfira 1 mL de uma diluição adequada de amostra em diluente estéril diretamente para o frasco de caldo EB aprimorado.
2. Voltar a colocar e aperte 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 a $37 \pm 0,5$ °C por 6 a 8 horas, dependendo da sensibilidade necessária (Tabela 3).

Tabela 3. Tempo de incubação e intervalo dinâmico potencial a $37 \pm 0,5$ °C.

Tempo de incubação*	Faixa de UFC	Resultados
6 horas \pm 10 minutos	500 - 250,000	Enumeração
7 horas \pm 10 minutos	50 - 50,000	Enumeração
8 horas \pm 10 minutos [†]	<5 - 5,000	Presença/ausência

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

†A incubação para resultados de presença/ausência pode ser estendida para até 24 horas.

Etapa 2: Detecção

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



Dispositivos de detecção e enriquecimento MicroSnap® EB

Etapa 1: Enriquecimento da amostra

1a Surface

1a. Superfície: Esfregue uma área de 10 x 10 cm com o dispositivo de enriquecimento à temperatura ambiente* (RT). Enrichment Device.

1b Liquids

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

1c Solid Samples

1c. Amostras sólidas: Adicione 1 mL de diluição da amostra sólida diretamente no RT

2

2. Reinsira o bulbo da Snap-Valve no tubo do swab.

3

3. Ative o dispositivo. Dobre o bulbo, quebrando a Snap-Valve.

4

4. Levante o bulbo (1 a 2 polegadas) e aperte para liberar o líquido no fundo do tubo.

5

5. Recoloque o bulbo no tubo e agite-o suavemente para misturar a amostra no líquido.

6

6. Incubar a $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ por 6 ou 7 h \pm 10 min (quantitativo) ou 8 - 24 h (qualitativo).

Etapa 2: Detecção ou medição

1

1. Equilibre o dispositivo de detecção à temperatura ambiente. Agite para que o líquido chegue ao fundo.

2

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

3

3. Ative o dispositivo de detecção (teste) quebrando a válvula de pressão. Aperte o bulbo para liberar o líquido no tubo.

4

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

5

5. EnSURE® Touch , Aplicativo MicroSnap®: Se a amostra estiver programada, selecione a amostra; caso contrário, selecione **Teste rápido**. Em seguida, apertar **Executar teste**.

6

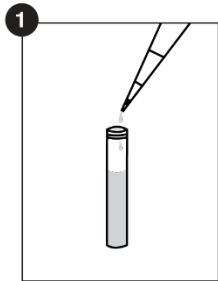
6. O EnSURE Touch salva automaticamente os resultados. Registre e sincronize o luminômetro sem fio com o software SureTrend® para ver relatórios e conjuntos de dados.

* Temperatura ambiente = 20 a 25 °C.

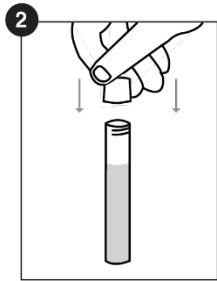


MicroSnap® Enhanced EB Broth Vial e dispositivo de detecção MicroSnap

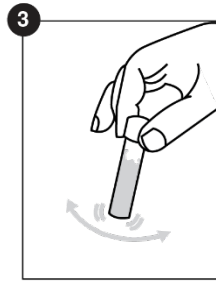
Etapa 1: Enriquecimento da amostra



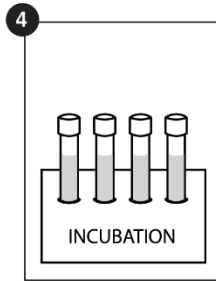
1. Equilibre a amostra e o caldo EB de 20 a 25 °C. Adicione 1 mL de amostra ao caldo EB aprimorado.



2. Recoloque e aperte a tampa.



3. Agite ou vortex por 10 segundos.

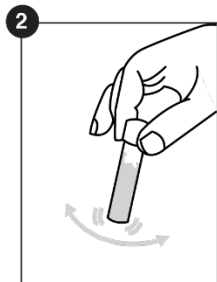


4. Incubar a $37 \pm 0,5$ °C por 6 ou 7 h ± 10 min (quantitativo) ou 8 - 24 h (qualitativo).

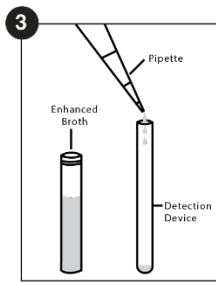
Etapa 2: Detecção ou medição



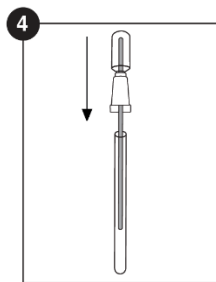
1. Equilibre o dispositivo de detecção à temperatura ambiente. Agite para trazer o líquido para o fundo.



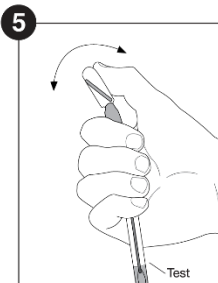
2. Agite ou vortex por 10 segundos.



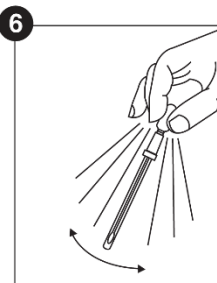
3. Transfira assepticamente 0,1 mL da amostra enriquecida para o Dispositivo de Detecção.



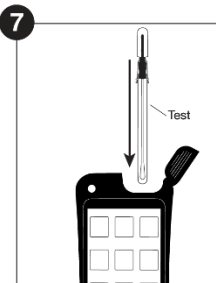
4. Remonte o dispositivo de detecção em seu estado original.



5. Ative o dispositivo quebrando a Snap-Valve. Aperte o bulbo para liberar o líquido no tubo.



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



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



8. EnSURE Touch salva automaticamente os resultados. Registre e sincronize o luminômetro sem fio com o software SureTrend® para ver relatórios e conjuntos de dados.