

MUDANDO DE MÉTODOS DE ANÁLISE

AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA

DIRCE M.Y.YANO

14.06.10

QUALIDADE EM LABORATÓRIOS DE ENSAIO ISO NBR ABNT 17025:2005

“Garantia da Qualidade”

“Conjunto de ações planejadas e sistemáticas para garantir que um produto ou um serviço vai satisfazer os requisitos da qualidade.”

“Controle de Qualidade”

“Conjunto de técnicas e atividades usadas para cumprir os requisitos da qualidade.

Ações concretas no dia a dia.”

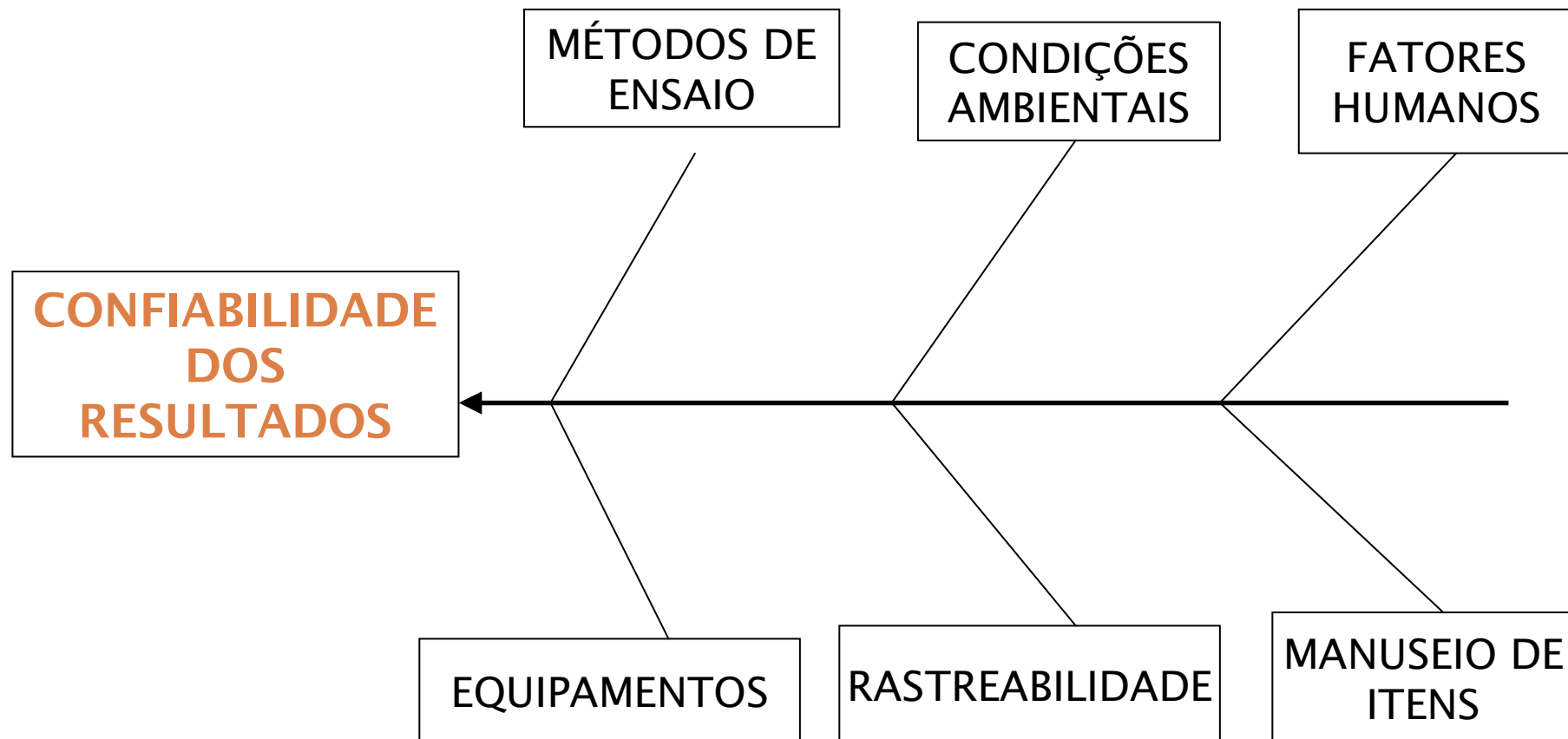
PORQUE IMPLEMENTAR A ISO?

- **Melhorar os processos**
- **Aumentar segurança**
- **Melhorar qualidade global**
- **Aprimorar equipes de trabalho**
- **Oferecer maior confiança aos cliente**
- **Diminuir custos operacionais**

REQUISITOS DE GERÊNCIA



REQUISITOS TÉCNICOS



AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA

ABNT NBR ISO/IEC 17025

Elemento 4.6 – Aquisição de serviços e insumos

Requisito 4.6.1

O laboratório deve ter política e procedimentos para seleção e compra de serviços e suprimentos utilizados que afetem a qualidade dos ensaios. Devem existir procedimentos para compra, recebimento e armazenamento de materiais de consumo do laboratório que sejam importantes para os ensaios.

Requisito 4.6.2

O laboratório deve garantir que os suprimentos e materiais de consumo adquiridos que afetem a qualidade dos ensaios não sejam utilizados até que tenham sido inspecionados ou verificados de alguma outra forma... Devem ser mantidos registros das ações tomadas para verificar a conformidade.

AValiação DE MEIOS DE CULTURA

Elemento 4.6 – Aquisição de serviços e insumos

Requisito 4.6.3

Os documentos de aquisição dos itens que afetam a qualidade do resultado do laboratório devem conter dados que descrevam os serviços e suprimentos solicitados. Estes documentos devem ter seu conteúdo técnico analisado criticamente e aprovado antes da liberação.

Requisito 4.6.4

O laboratório deve avaliar os fornecedores dos materiais de consumo, suprimentos e serviços críticos que afetem a qualidade de ensaios e calibrações e deve manter registros dessas avaliações, e listar os que foram aprovados.

AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA

AQUISIÇÃO DE INSUMOS

- **Aquisição → Requisitos → Procedimentos**
- **Registro → informações
codificação no laboratório**
- **Controle → manutenção
estoque
responsável**

AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA

➤ **Desidratados**

Comercialmente disponíveis

- **fornecedor**
- **avaliação**
- **validade – lote**
- **garantia da qualidade**

➤ **Formulados**

- **insumos de qualidade**
- **pessoal qualificado**
- **controle de qualidade**

AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA

- **Meios prontos para o uso**

- **Comercialmente disponíveis**
 - **fornecedor**
 - **avaliação**
 - **validade – lote**
 - **controle de qualidade**

AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA

NUTRIÇÃO MICROBIANA

- Os microrganismos realizam reações químicas e organizam as moléculas em estruturas específicas.
- A expressão final dessa organização resulta no crescimento.

Os microrganismos requerem em quantidades diferentes de

macronutrientes e micronutrientes.

AValiação DE MEIOS DE CULTURA

MEIOS DE CULTURA

➤ Definição

“Formulações de substâncias em forma sólida, líquida ou semi sólida que contêm constituintes naturais ou sintéticas para promover a multiplicação, crescimento e manter a viabilidade dos microrganismos”.

AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA

Quanto à consistência

- **Meios líquidos** – exemplo: caldo nutriente.
- **Meios sólidos** – quando acrescentamos um agente solidificante → ágar (carboidrato).
- **Meios semi-sólidos** – quando acrescentamos menos Agar no meio.

AValiação DE MEIOS DE CULTURA

Quanto à função

Meios simples

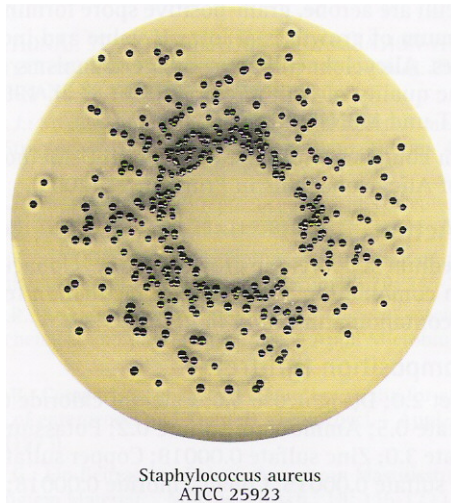
- permitem crescimento de bactérias de fácil crescimento.

Meios enriquecidos

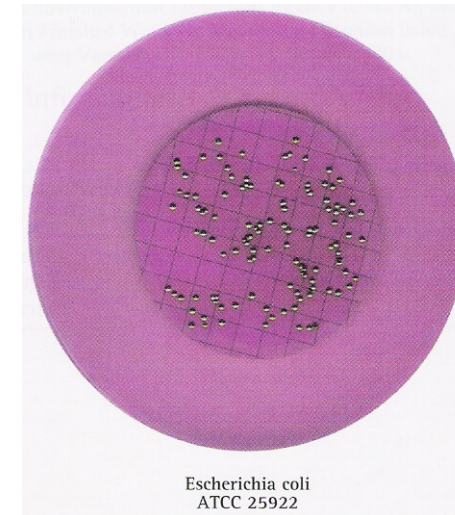
- bactérias de difícil crescimento exigem nutrientes específicos, como adição de vitaminas , ex: biotina, ácido pantotênico.

AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA

Ágar Baird-Parker



Ágar m-Endo LES



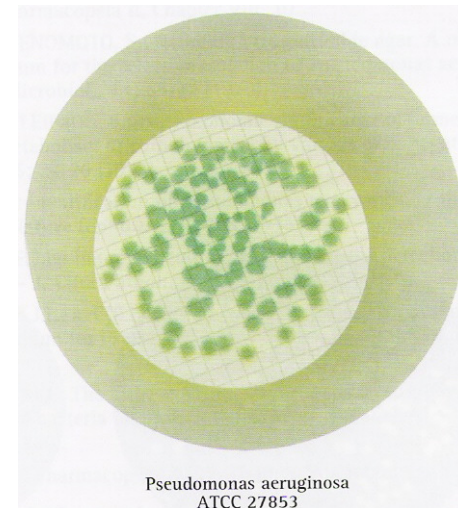
AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA

Ágar Levine

(Lactose Azul de metileno)

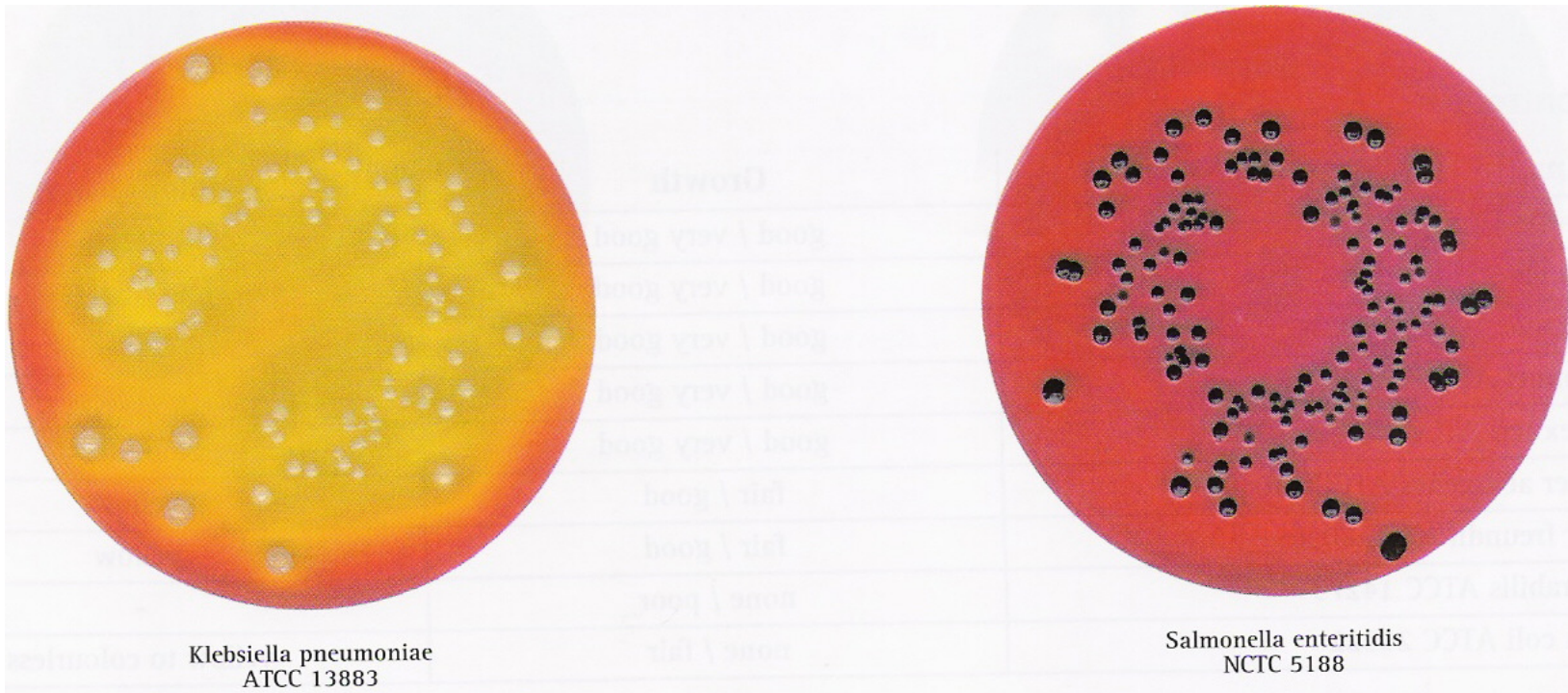


Ágar Seletivo para Pseudomonas CN



AValiação DE MEIOS DE CULTURA

Ágar XLD



AValiação DE MEIOS DE CULTURA

- Além de conhecer os meios de cultura, o microbiologista deve também saber como preparar corretamente.
- O êxito do trabalho depende não somente da escolha do meio de cultivo, mas também das condições físicas de cultivo (fatores ambientais) que são diferentes entre os microrganismos.
- Praticamente, a grande maioria dos meios comercialmente disponíveis (usados na rotina do laboratório) se encontram sob a forma de pó, granulados, desidratados, tornando fácil o seu preparo.

AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA

Norma ISO 11133-1/2009 e 11133-2/2004

Parâmetros

- **Checagem do pH**
- **Produtividade**
- **Seletividade**

Tipos de Meios de Cultura

- **Sólido**
- **Semi sólido**
- **Líquido**

AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA

Método

- Quantitativo
- Qualitativo
- Os métodos devem ser escolhidos pelo laboratório, baseados em técnicas aceitas.

AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA

- Meios sólidos, semi sólidos ou líquidos devem ser inoculados com uma alíquota de microrganismos alvo (positivo) e não desejado (negativo).
- As diluições devem ser preparadas a partir de culturas de trabalho.

AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA

Culturas de Trabalho - Contagem de células

- A partir da cultura de trabalho (24h), utilizando a escala de MacFarland (0,5) = 10^8 .
- Preparar os tubos de diluição (diluição decimal seriada) até 10^{-8} .
- Semear 1 mL das 5 últimas diluições em profundidade em placas estéreis.
- Distribuir aproximadamente de 15 a 20 mL de Ágar PCA previamente resfriado e mantido a $(46 \pm 1)^\circ\text{C}$. (fazer duplicata).
- Homogeneizar bem. Deixar solidificar.
- Incubar as placas em posição invertida na temperatura apropriada do microrganismo por 24h.
- Fazer as contagens dentro do limite de especificação de contagem.

AValiação DE MEIOS DE CULTURA

Meios seletivos e não seletivos

Quantitativo

Meios sólidos → Inoculação em profundidade

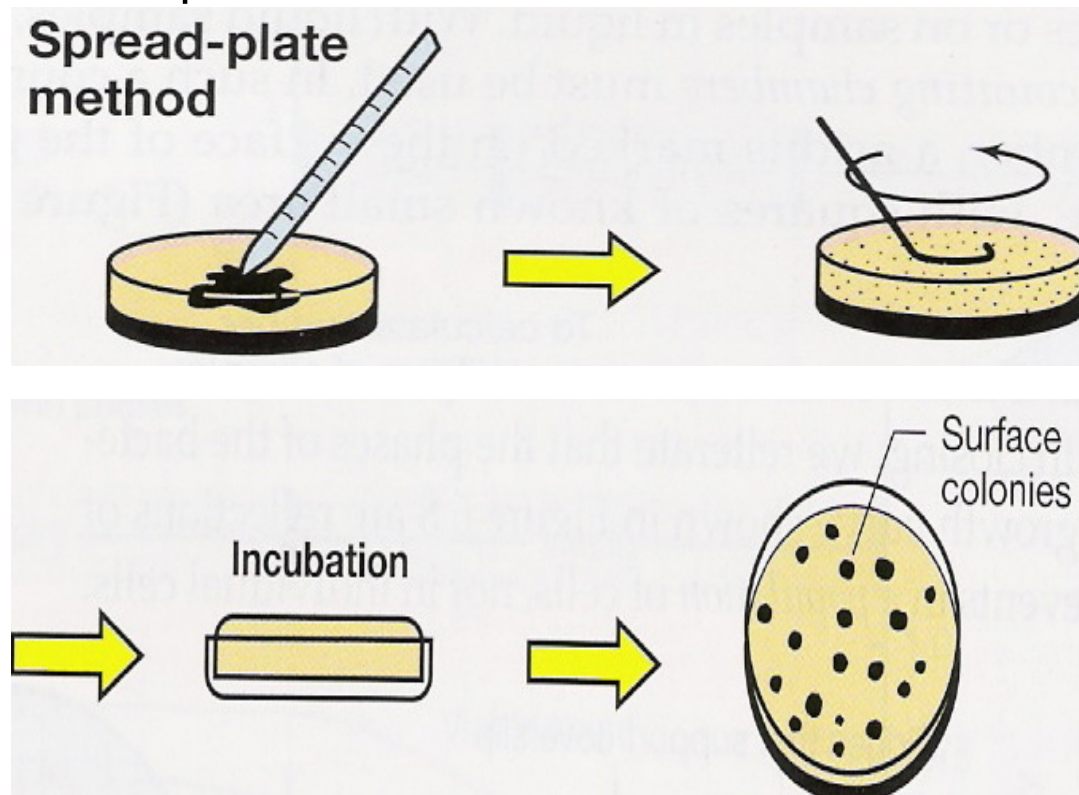
Inoculação em superfície

- Após a incubação, contar as colônias das placas da diluição que proporcionar contagem entre os limites especificados pelo método.
- A contagem será sempre na mesma diluição para os dois meios (avaliação e de referência).

AValiação DE MEIOS DE CULTURA

➤ Meios Sólidos

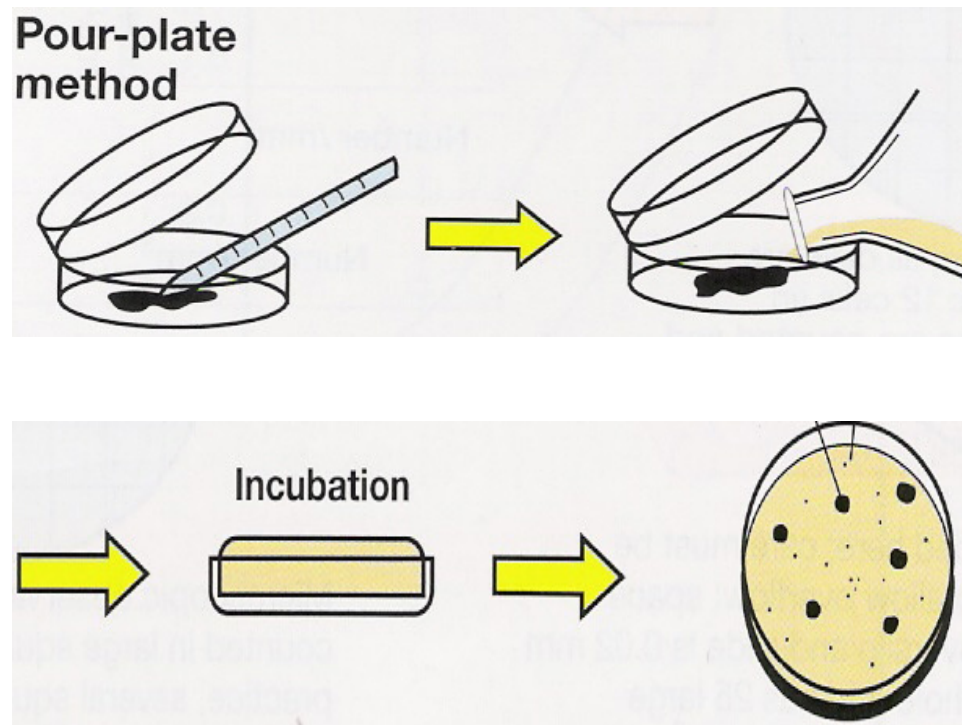
Inoculação em superfície



AValiação DE MEIOS DE CULTURA

➤ Meios Sólidos

Inoculação em profundidade (pour plate)



AValiação DE MEIOS DE CULTURA

Cálculo da Produtividade (P)

- Para calcular a produtividade a contagem deverá corresponder à mesma diluição para os dois meios.

$$P = NA / NR$$

- NA= número total de colônias obtidas no Meio de Avaliação.
- NR= número total de colônias obtidas no Meio de Referência.

Exemplo

- Meio de Avaliação= 200 ufc/mL na diluição (-6)
- Meio de Referência= 250 ufc/mL na diluição (-6)

$$P = (200 / 250) = 0,8$$

- A produtividade pode ser expressa em porcentagem (%).

A Produtividade de um meio deve ser $\geq 0,7$ por microrganismo, que pode crescer facilmente no meio.

AValiação DE MEIOS DE CULTURA

MEIOS SELETIVOS E NÃO SELETIVOS

Qualitativo

Meios líquidos

- Inocular 1 mL de cada diluição: 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} .
- Incubar os tubos na temperatura e tempo adequados para cada microrganismo.
- Após a incubação observar a maior diluição com crescimento (turvação do meio).

AValiação DE MEIOS DE CULTURA

Cálculo da produtividade (P)

$$P = DA / DR$$

DA= diluição com turbidez no Meio de Avaliação

DR= diluição com turbidez no Meio de Referência

Exemplo

- Meio de Avaliação = 8 (última diluição com turvação: - 8)
- Meio de Referência = 10 (última diluição com turvação: -10)

$$TP = \frac{8}{10} = 0,8$$

AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA

- Para o método qualitativo, o crescimento do microrganismo não desejado (negativo) no meio seletivo deve ser a inibição de crescimento.

AValiação DE MEIOS DE CULTURA

Método qualitativo com um tubo ou um frasco

- Inocular com alça de 1 μ L, o microrganismo alvo diretamente no meio a ser avaliado.
 - Fazer o mesmo com microrganismo não desejado.
 - Leitura → Visual
 - Resultado
 - 0 → sem turbidez
 - 1 → pouca turbidez
 - 2 → bem turvo
- O valor para microrganismo alvo deve ser 2.

AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA

Cálculo do Índice de Crescimento Absoluto (ICA)

- Dividir a placa em quadrantes e identificar com a numeração 1, 2, 3, 4 e um traço no centro da placa correspondente ao número 5.
- Preparar a suspensão do inóculo a 10^8 UFC/mL.
- Proceder da mesma forma na placa com meio de referência.

Cálculo= Cada estria é dado um valor de 0,2. Multiplicar pelo número de estrias com crescimento.

- Crescimento na estria central é dado o valor de 1.

Cálculo do Índice de Crescimento Relativo (ICR)

- O ICR para um determinado microrganismo é a comparação entre o ICA do meio em avaliação e o ICA do meio de referência.
- **Avaliação**→ Para todos os microrganismos em um meio de avaliação o ICA deve ser maior ou igual a 3,5.

AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA

- Exemplo de formulário de Avaliação de Meio de Cultura

MR= meio de referência

AN= ágar nutriente

Meio	Tipo	Função	Incubação	Microrg. Controles	MR	Método	Critério	Caract.
Baird-Parker	Sólido	Produtividade	24h-48h (35 ± 2)°C	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	TSA	Quantitativo	>70%	Colônias Negras Halo
		Seletividade	48h (35 ± 2)°C	<i>E. coli</i> ATCC 25922	AN	Qualitativo	Inibição	-

AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA

QUALIDADE DA ÁGUA

- **Reservatório de água → conservação, higienização**
- **Deionizador , Osmose Reversa → controles → registro.**
- **Controles → microbiológico e físico-químico.**

AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA

CONTROLE MICROBIOLÓGICO (tipo III/ASTM)

- Procedimentos → parâmetros - limites → registros
- Parâmetros → Contagem Total = 10^4 ufc/mL
→ Coliformes = ausência em 100mL
- Frequência → semanal, quinzenal...

CONTROLE FÍSICO QUÍMICO (tipo III/ASTM)

- Frequência → diária → registro
 - condutividade - $0,25\mu\text{S}$
 - resistividade - 4,0 megaohms-cm
 - pH (5,5 ~7,5)
 - cloro residual = 10ppb
 - Sílica= 500ppb

REFERÊNCIAS

- **Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº62 de 26/08/03. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de produtos de Origem Animal e Água. Brasília, 2003.**
- **EA/EURACHEM - EA-04/10. Accreditation for Microbiological Laboratories. 2002.**
- **ABNT NBR ISO/IEC 17025- Requisitos Gerais para a Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração. 2005.**
- **ISO. International Standard. ISO3696. Water for Analytical Laboratory Use - Specifications and Test Methods. 1987.**

REFERÊNCIAS

- **EA/EURACHEM – EA-04/10. Accreditation for Microbiological Laboratories. 2002.**

- **ABNT NBR ISO/IEC 17025- Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. 2005.**

- **AOAC INTERNATIONAL. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th ed. 2005.**

- **ISO 11133. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines on preparation and production of culture media – Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory. 2009.**
Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media. ISO 11133-2004.

REFERÊNCIAS

- APHA American Public Health Association. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4th ed. Washington DC. 2001.
- ISO. International Standard. ISO7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – **General rules for microbiological examinations**. 2007.