

P&D AQUA coli – ONPG/MUG

Instruções de uso

Indicações

Deteção quantitativa e qualitativa de coliformes totais e *Escherichia coli* em amostras de água por de substratos enzimáticos específicos que possibilitam a recuperação e a identificação desses microrganismos presentes na água.

Tipo de amostras de água: bruta, tratada, salobra, salgada e efluente, superficial, subterrânea e água de reuso

Princípio

Este método se baseia na utilização de um substrato específico, que permite a pesquisa simultânea de coliformes totais e de *Escherichia coli* em menor tempo. Os testes são baseados na atividade da β -galactosidase sobre o substrato ONPG (O-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo) e da β -D-glicuronidase sobre o substrato MUG (4-metilumbeliferil- β -D-glicuronídeo).

O teste baseia-se na adição dos substratos em 100 ml de amostra de água, seguido de incubação de 35°C a 37°C por 24 horas. A atividade dos coliformes totais sobre o substrato ONPG produz uma coloração amarela, indicando a sua presença. A presença da *Escherichia coli* pode ser confirmada por fluorescência sob a luz ultravioleta (UV) (365 nm), devido à sua atuação sobre o substrato MUG. A sensibilidade da metodologia para *Escherichia coli* é de 1 UFC/100ml de amostra. A especificidade para não-coliformes é 10⁶ UFC/100mL. Pode ser utilizado em cartelas estéreis de 51 ou 97 cavidades para contagens de até 200NMP/100ml ou 2.419NMP/100ml, respectivamente, conforme 9223 ENZYME SUBSTRATE COLIFORM TEST - 24th edition of Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.

Componentes

Componentes	g/L
Nutrientes e sais minerais	19,4
Substratos cromogênicos	0,6

Informações importantes

- Produto para uso laboratorial.

- Utilizar de acordo com as instruções.
- Todas as amostras devem ser manipuladas como potencialmente infecciosas e destruídas de acordo com as normas de biossegurança.
- Não reutilizar.
- Não utilizar após o prazo de validade.
- Armazenar em temperatura ambiente (15° a 30°C).
- Não congelar.
- validade informado na embalagem.

Procedimento

1. Equipamentos e materiais necessários

- Estufa de incubação 35°C a 37°C.
- Recipientes estéreis para coleta com 100 ml de capacidade.
- Frascos que não emitem fluorescência quando expostos à luz ultravioleta de 365 nm, com capacidade para 100 mL.
- Comparador de cor.(Não fornecido no kit)
- Câmara de Luz UV 365 nm.

2. Procedimento

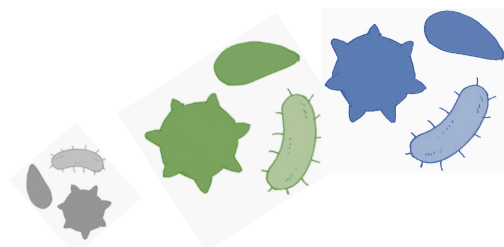
2.1 Coleta de amostra

- **Tipo de amostra:** águas de poços, fontes, água mineral, reservatórios, sistemas de distribuição e determinação da eficiência operacional de uma estação de tratamento de águas e outras amostras de águas.
- As amostras devem ser coletadas em recipientes estéreis e testadas o mais rapidamente possível. Do contrário, manter em geladeira (2-8°C) por até 24h.
- Proceder à amostragem de 100 ml de amostra em recipiente estéril seguindo como descrito abaixo:

Água clorada: acrescentar 0,1 ml de solução de Tiossulfato de Sódio a 10%.

Água in natura: acrescentar 0,2 ml de solução de EDTA 15% objetivando quelar metais presentes na amostra que possam interferir no desenvolvimento analítico.

- Procedimentos assépticos devem ser adotados para a realização da coleta.



- Análise as amostras o mais rápido possível após sua chegada ao laboratório.

3. Procedimento técnico

3.1 Teste qualitativa

- Abrir o sachê contendo o substrato cromogênico e acrescentar todo o conteúdo no frasco contendo 100 ml de amostra da água.
- Agitar suavemente até que ocorra a diluição completa e a homogeneização do meio.
- Incubar o frasco teste em estufa a 35° a 37°C durante 24h.

3.1.1 Leitura e interpretação do teste

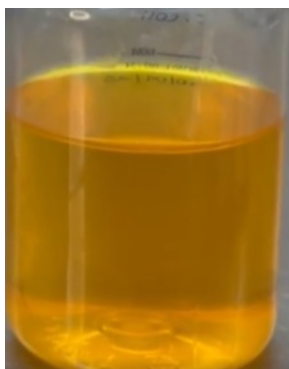
- Coliformes totais e *Escherichia coli* negativo:** A amostra permanece inalterada e sem turvação indica.
- Coliformes totais positivo:** A amostra desenvolve coloração amarela.
- Escherichia coli* positivo:** A amostra desenvolve cor amarela e é observada fluorescência azul esverdeada quando exposta a luz UV 365 nm, em ambiente escuro.

Importante: Não utilizar frascos de vidro, pois os mesmos emitem fluorescência e interferem na interpretação do teste.

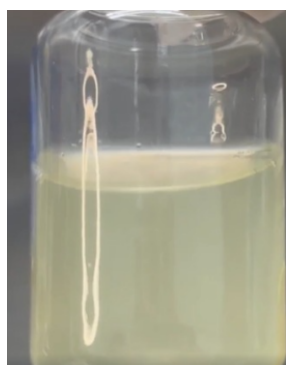
Interpretação dos resultados

Coliformes totais;;

a) Positivo



b) Negativo

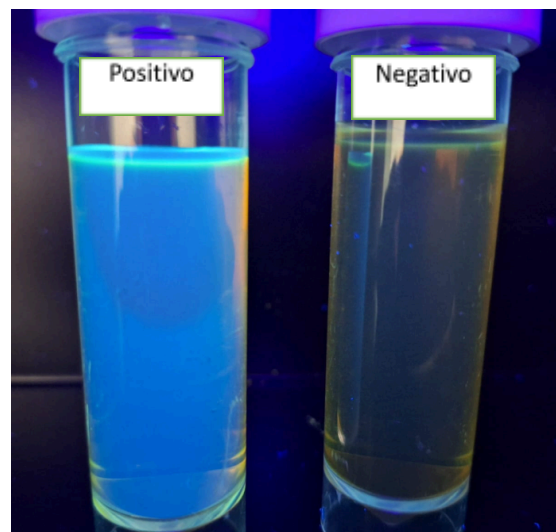


Nota: **Amostras positivas:** A tonalidade amarela pode alterar conforme o tipo de microrganismo, geralmente a presença de *E.coli* em grande quantidade, tende a deixar a reação mais alaranjada.

Amostras negativas: Amostras negativas não alteram a cor do substrato, mas podem apresentar leve turvação.

Escherichia coli:

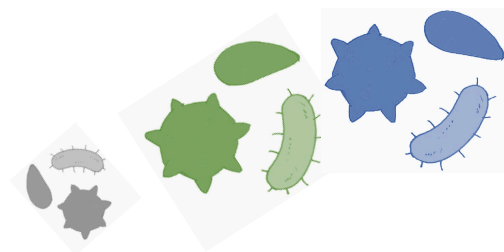
Emissão de fluorescência = Positivo



3.2 Teste quantitativo

- Abrir o sachê contendo o substrato cromogênico e acrescentar todo o conteúdo no frasco contendo 100 ml de amostra da água.
- Agitar suavemente até que ocorra a diluição completa e a homogeneização do meio. Obs: O complexo enzimático pode demorar até 30 minutos para completa dissolução.
- Despejar a amostra na placa conforme utilização do laboratório.
- Fechar a placa (não fornecido no kit) utilizando uma seladora e verificar se não há vazamentos e incubar em estufa a 35°C durante 24 horas.
- Após a incubação, conte o número de poços que apresentaram resultado positivo (mudança de cor ou fluorescência).
- A Fluorescência pode ser avaliada com luz UV 365nm, em ambiente escuro.
- Utilize a tabela de Número Mais Provável (NMP) (não fornecido no kit), conforme o tipo de cartela de referência que estiver disponível e adequada ao uso.

4. Liberação dos Resultados



4.1 Não houve crescimento

a. Prova qualitativa

- Ausência de coliformes totais/ 100ml
- Ausência de *Escherichia coli*/ 100ml

4.2 Havendo crescimento

a. Prova qualitativa

- Presença de coliformes totais/100ml
- Presença de *Escherichia coli* / 100ml

Limitações

- Resultados falso positivo ou negativo podem ocorrer, com maior frequência, nas seguintes situações:
- Elevado grau de contaminação, sem diluição prévia.
- Tempo longo entre a coleta da amostra e análise.
- Incubação em temperatura inadequada.
- Transporte inadequado da amostra.
- Erro de leitura e interpretação.
- Utilização de materiais contaminados.
- Utilização de material vencido.
- Utilizar frascos que emitem fluorescência.

Controle de qualidade

Microrganismo	Concentração	Resultado esperado
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	10-100 UFC	Crescimento e viragem de cor para amarelo. Na luz UV fluorescência azul esverdeada.
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 13883)	10-100 UFC	Crescimento e viragem de cor para amarelo
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	>10 ⁶ UFC	Inibição completa
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	<10 ⁶ UFC	Inibição completa

Validade



1 ano após data de fabricação

Referências bibliográficas

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução RDC nº 275 de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico de Características Microbiológicas para Água Mineral Natural e Água Natural. D.O.U. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 23 de setembro de 2005.

APHA. Standard Methods Committee of the American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation. 9223 enzyme substrate coliform test In: Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater. Lipps WC, Baxter TE, Braun-Howland E, editors. Washington DC: APHA Press.