



MICROPHAR

2024

PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO

Este manual foi criado carinhosamente pela equipe Microphar com o objetivo de auxiliar o dia-a-dia do laboratório.

Este guia traz o passo-a-passo para conduzir a Promoção de Crescimento em meios de cultura, como preparar uma suspensão de micro-organismos e uma Seção de Perguntas mais frequentes.

SUMÁRIO

CONTEÚDO

- Sobre a Microphar
- Conceitos gerais
- Preparo de inóculo
- Diluição seriada
- Passo a passo do ensaio
- Conclusão



SOBRE A MICROPHAR



MEIRE OTA
FUNDADORA

Sou bióloga de formação e meu amor pela microbiologia começou no ensino médio, durante o curso técnico. Desde o primeiro ano de faculdade até os dias de hoje, a microbiologia está presente na minha vida profissional. Sempre gostei muito de ensinar e acredito que a educação pode transformar vidas.

Atuando com indústrias farmacêuticas desde 2008 vejo a escassez de treinamentos específicos voltados para nossa área e por esse motivo, a Microphar foi desenvolvida para auxiliar novos profissionais, desenvolver profissionais mais capacitados e solucionar problemas do dia-a-dia.

A Microphar é uma consultoria que oferece um programa virtual completo para quem trabalha no Controle de Qualidade Microbiológico em indústrias farmacêuticas, cosméticas, veterinárias e de alimentos. Fundada em 2023, oferecemos opções de aprendizagem flexíveis para todos os tipos de alunos. Nosso objetivo é fornecer diversas opções que atendam a indivíduos que desejam uma experiência de aprendizagem personalizável, mas ainda assim, priorizam uma educação de alto nível. Se você tiver alguma dúvida ou tiver interesse em se inscrever no nosso Curso online, não hesite em entrar em contato.

Acesse nosso site para saber mais sobre o treinamento completo para o Controle Microbiológico

Treinamento completo Controle Microbiológico

Nossos módulos foram criados com o objetivo de atender a todos os tipos de público: desde os profissionais iniciantes que estão começando suas carreiras e desejam conhecer um ensaio novo, até profissionais experientes que desejam se aprofundar em análises específicas.

www.microphar.com.br



PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO

Quando falamos sobre Promoção de crescimento, normalmente lembramos primeiramente dos meios de cultura seletivos, com as características particulares de cada meio frente ao seu micro-organismo alvo. No entanto, os meios não-seletivos e caldos também requerem o ensaio de Promoção de crescimento para poder ser utilizado durante a rotina de trabalho. Na figura abaixo, podemos verificar os tipos de meios e como sua interpretação é realizada! Iremos ver os detalhes nas próximas seções.



REFERÊNCIAS

O conteúdo deste guia foi baseado nas referências oficiais farmacopeicas: Farmacopéia Brasileira, 6 Edição (5.5.3.1.4 Adequação dos métodos farmacopéicos) e Farmacopeia Americana, capítulos <60> "Tests for Burkholderia Cepacia Complex", <61> "Microbial Enumeration Tests" e <62> "Test for Specified Microorganisms". A tabela abaixo é encontrada nos capítulos oficiais e, às vezes, pode ser confusa de ser interpretada.

Quadro 1. Promoção de crescimento conforme farmacopeias para meios de contagem microbiana

Micro-organismos	Preparo do inóculo	Contagem microbiana de aeróbios totais	Contagem total de bolores e leveduras	Critério de aceitação
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, NCIMB 9518, CIP 4.83, ou NBRC 13276	Digesto Caseína de Soja Agar ou Caldo 30° a 35° 18 a 24 horas	Digesto Caseína de Soja Agar e Caldo 30° a 35° < 100 UFC < 3 dias		O crescimento obtido não deve diferir de um fator 2 do valor calculado para um inóculo padronizado (USP-NF)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118, ou NBRC 13275				
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633, NCIMB 8054, CIP 52.62, ou NBRC 3134				
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231, NCPF 3179, IP 48.72, ou NBRC 1594	Digesto Caseína de Soja Agar e Caldo 30° a 35° < 100 UFC < 5 dias	Sabouraud Dextrose Agar 20° a 25° < 100 UFC < 5 dias	Comparar o crescimento obtido que não deve ser inferior a 50% em relação ao inóculo padronizado (Farmacopéia Brasileira)	
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404, IMI 149007, IP 1431.83, ou NBRC 9455				

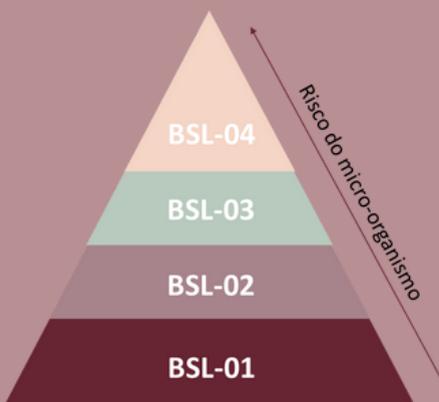
Esse quadro é o mais comum de ser encontrado em procedimentos operacionais, mas sua interpretação nem sempre é a melhor para ser avaliada. Pensando nisso, os esquemas deste guia foram montados para deixar o quadro acima e abaixo, mais fáceis de serem compreendidos.

BIOSSEGURANÇA

O laboratório microbiológico de Controle de Qualidade farmacêutico, cosmético e de alimentos, normalmente realizam manipulação de micro-organismos atenuados e sem grande risco para a saúde do analista, mas alguns cuidados sempre devem ser tomados, para evitar contaminações acidentais. Entender sobre os requisitos de biossegurança é tão importante quanto entender uma diluição seriada, uma vez que isso manter a segurança é sempre o objetivo de qualquer empresa séria.

Conceitos:

A biossegurança compreende um conjunto de ações destinadas a prevenir, controlar, mitigar ou eliminar riscos inerentes às atividades que possam interferir ou comprometer a qualidade de vida, a saúde humana e o meio ambiente (Fonte: Biossegurança em saúde: prioridades e estratégias de ação – Brasília 2010)



Basicamente, os níveis de biossegurança estão divididos conforme a imagem ao lado, idivididos conforme o risco de contaminação:

- BSL-01: com micro-organismos sem riscos para o manipulador ou para a comunidade. Exemplo: *Bacillus spizizenii*
- BSL-02: Agentes com risco moderado para o manipulador e baixo para a comunidade e há sempre um tratamento preventivo. Exemplo: *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium*
- BSL-03: Agentes que apresentam risco grave para o manipulador e moderado para a comunidade, e nem sempre há tratamento. Exemplo: *Bacillus anthracis*

BSL-04: Agentes que apresentam risco grave para o manipulador e para a comunidade, não há tratamento na maioria das vezes. Exemplo: ebola

Micro-organismos a partir da classe BSL-02 requerem o uso de contenção em grupo, ou seja, sua manipulação deve ser obrigatoriamente sob cabine de biossegurança.

Para micro-organismos de classe BSL-01, o uso de cabine não é obrigatório, mas devido a concentração, muitos lugares acabam padronizando a manipulação. Um exemplo clássico de uso desses micro-organismos fora da cabine são os ensaio de doseamento de antibióticos.

DILUIÇÃO SERIADA

Um dos ensaios essenciais para qualquer microbiologista, mas também um ensaio que nem sempre é compreendido.

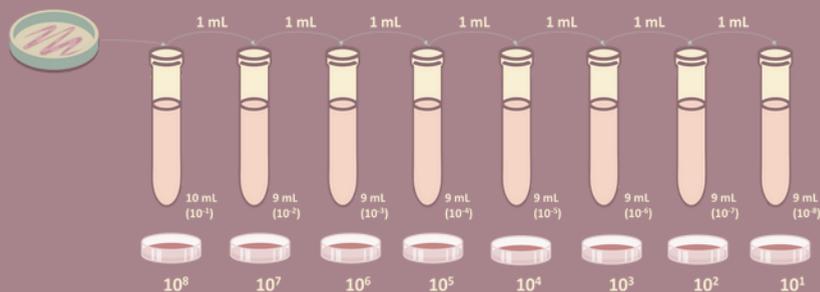
O uso de uma matemática exponencial acaba dificultando o cálculo da concentração final.

Saber a lógica de uma diluição seriada é importante para que haja agilidade durante os ensaios, sem perda de recursos ou tempo de análise.

Quando trabalhamos com micro-organismos, alguns pontos devem ser seguidos e sempre são questionados em auditorias:

- Utilizar micro-organismos até 5 passagens da cultura original: sempre se atentar a passagem que foi adquirida, pois a contagem não deve ser a partir do recebimento, mas sim da passagem que foi recebida. Por exemplo: culturas recebidas em 3^o passagem, só podem ser repicadas mais 2 vezes. Esse requerimento é para evitar a mutação do micro-organismo e, consequentemente, perda de eficácia do ensaio.
- A suspensão de micro-organismos deve ser utilizada em até 24 horas se mantidas refrigeradas de 2 a 8°C ou por 2 horas a temperatura ambiente (FB, pág.435). Esse ponto dificulta bastante o seu uso, principalmente, se você utiliza a técnica de diluição seriada para quantificar sua suspensão antes de usá-la, pois a partir do momento em que você tem o resultado em placa, sua suspensão inicial já venceu.

A diluição clássica é como apresentado na figura abaixo:



Antes de aprofundarmos sobre a diluição seriada é essencial que a primeira diluição seja padronizada para que os resultados obtidos sejam o mais próximo do desejado.

Infelizmente, como há o requerimento das farmacopéias em utilizar as suspensão de micro-organismos em até 24 horas, é necessário encontrar técnicas que seja possível prever a quantidade da suspensão inicial.

Como para a promoção de crescimento, é necessário a utilização de uma suspensão de micro-organismos com < 100 UFC por teste, há um desafio maior para atingir uma concentração precisa inicial. Iremos explorar 3 técnicas para que seja possível atingir essa concentração ideal.

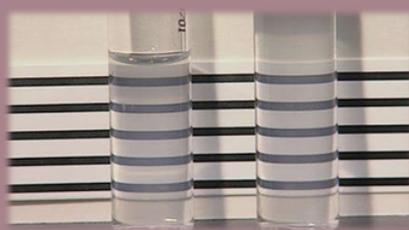
DILUIÇÃO SERIADA

DENSITÔMETROS / UV/ MCFARLAND

Diluição a partir de colônia de 18-24 horas (sem armazenamento):

Vantagens: barato, não requer armazenamento, conforme farmacoceias

Desvantagens: dificuldade na padronização, mais trabalhosos



A padronização da suspensão inicial pode ser realizada por essas 3 técnicas da seguinte forma:

- Escala McFarland: Os padrões McFarland são padrões de turbidez usados para estimar o número de bactérias em uma suspensão líquida.

Os padrões foram desenvolvidos por McFarland, que criou uma série de soluções de sulfato de bário para aproximar o número de bactérias em soluções de igual turbidez. Originalmente, os padrões são preparados adicionando cloreto de bário ao ácido sulfúrico, o que resulta na precipitação do sulfato de bário. A turbidez de uma suspensão bacteriana é então comparada visualmente com a turbidez do padrão apropriado. Atualmente, as escalas usam partículas de látex para aumentar o tempo de validade.

- Densitômetros: equipamentos capazes de medir a turbidez da suspensão e a leitura é dada na escala McFarland. São ótimos investimentos, pois são relativamente baratos e a precisão é maior, pois não depende do ajuste no olho.
- Leituras em equipamentos de UV (Ultra-violeta): leituras de micro-organismos são feitas normalmente em comprimento de luz visível (em 580 nm) e podem ser padronizadas comparando sua leitura com uma diluição seriada.

Micro-organismos	Quantidade Escala: 0,5	Comprimento	Diâmetro
<i>Bacillus</i> ssp ⁽¹⁾	1 x 10 ⁶ UFC/mL	4–10 µm	0,25–1,0 µm
<i>Pseudomonas</i> ssp ⁽¹⁾	6 x 10 ⁷ UFC/mL	1,5–3,0 µm	0,5–0,8 µm
<i>Escherichia coli</i> ⁽¹⁾	5,7 x 10 ⁷ UFC/mL	1,0–2,0 µm	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ⁽¹⁾	4,3 x 10 ⁷ UFC/mL	1,0 µm	-
<i>Candida albicans</i> ⁽²⁾	1,4 x 10 ⁶ UFC/mL	10 µm	-
<i>Salmonella</i> ⁽¹⁾	6 x 10 ⁷ UFC/mL	2–0,5 µm	1,5 µm

(1) Lozano et al. Low accuracy of the McFarland method for estimation of bacterial populations. *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 12(31):736-740, 2018

(2) Rapid Antifungal Susceptibility Determination for Yeast Isolates by Use of Etest Performed Directly on Blood Guinea et al. Samples from Patients with Fungemia. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(6):2205–2212, 2010

Um erro muito comum é utilizar a escala McFarland, utilizando a escala 0,5 como uma suspensão de 10 UFC para qualquer tipo de micro-organismo. Isso pode gerar quantificações erradas, uma vez que o tamanho da célula e sua forma de crescimento podem conter um número de células diferente mesmo em uma mesma turbidez. O quadro ao lado podemos verificar o tamanho diferente de cada micro-organismo e quanto ela representa na escala.

DILUIÇÃO SERIADA

SUSPENSÃO COM VOLUME PADRÃO

Suspensão com volume padrão: Diluição a partir de colônia de 18-24 horas (com armazenamento)

Vantagens: barato, otimização de uso, padronização

Desvantagens: necessidade de validação de armazenamento, colônias injuriadas



EXEMPLO

Slant preparado com 10 mL com angulação padronizada e tubo padronizado

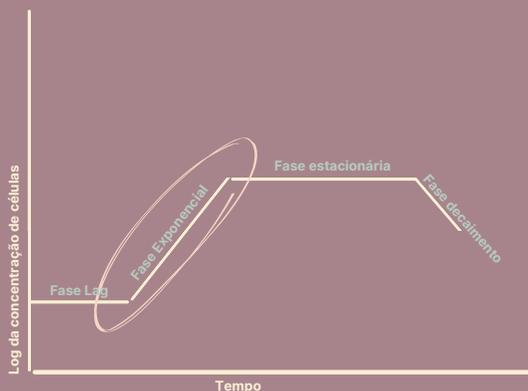
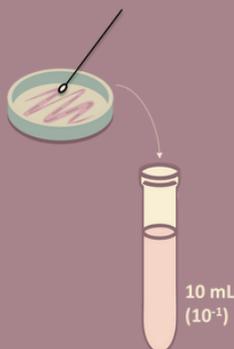


Adição de 5 mL de Solução fisiológica e desprendimento com loop de toda a superfície

Essa técnica também requer que seja feita uma padronização do repique inicial para que seja possível atingir a mesma concentração em todo ensaio.

Padronizar uma técnica manual pode ser desafiador e requer fotos e instruções claras para que seja possível atingir a concentração ideal.

Outro ponto importante é sempre utilizar culturas com crescimento na Fase Exponencial da curva de crescimento. Ou seja, por volta de 18 a 24 horas de incubação, para a maioria das bactérias.



Suspensão de *Bacillus* podem gerar uma dificuldade a mais no momento da diluição pela sua característica durante o seu crescimento. Ela contém uma membrana lipídica espessa, o que dificulta sua dispersão em suspensão. Clique [aqui](#) para ver o processo para preparo de suspensão de esporos.

DILUIÇÃO SERIADA

LIOFILIZADAS E PADRONIZADAS

Culturas liofilizadas e padronizadas: Culturas liofilizadas de fornecedores certificados

Vantagens: facilidade de uso, uniformidade nos resultados

Desvantagens: preço



A forma mais certa para não errar a quantificação é o uso de culturas já quantificadas e prontas para uso. Muitas já possuem certificado do fornecedor e sua quantificação pode ser usada como controle positivo (sem utilizar um lote aprovado). Só lembrando que para usar como controle positivo, uma comprovação da quantidade deve ser realizada antes do uso.

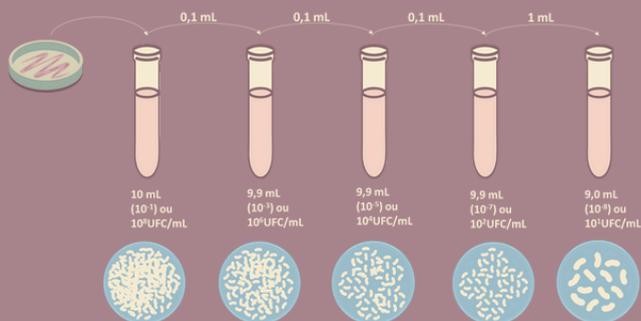
Há vários fornecedores de culturas de referência disponíveis como nas fotos acima e o único ponto negativo seria o preço. Culturas sem quantificação são encontradas por menos da metade do valor das culturas quantificadas.

Se o laboratório pode investir um pouco mais, as culturas quantificadas sempre serão a melhor opção em termos de agilidade na análise e precisão dos resultados.

DILUIÇÃO SERIADA

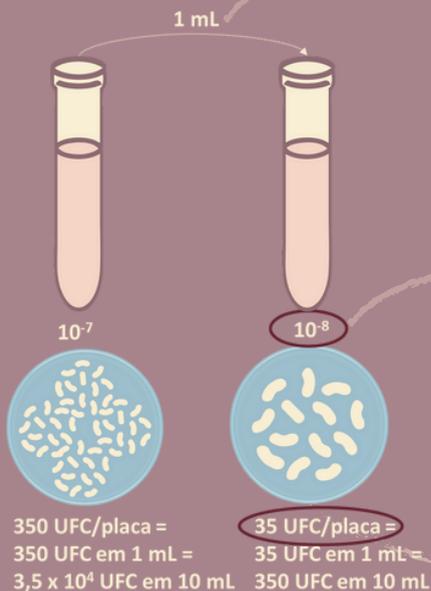
PASSO A PASSO PARA QUANTIFICAÇÃO

Agora que vimos como padronizar a solução inicial podemos partir para as etapas de diluição. O primeiro ponto é que não precisamos seguir a quantidade de tubos dos livros padrões. Utilizar variações de alíquota e quantidade de diluente irá facilitar sua rotina do dia-a-dia, conforme imagem abaixo:



Otimizar o número de tubos facilita a rotina

O cálculo de quantificação é feito normalmente através da multiplicação do fator de diluição (retirando o expoente negativo) vezes a quantidade encontrada na placa. No entanto, você consegue entender a lógica da quantificação reversa?



Se em uma placa é obtido 35 UFC, a partir de uma alíquota de 1 mL, quer dizer que no tubo de origem havia 35 x 10 ml, ou 350 UFC.

Esses 350 UFC vieram de 1 mL da diluição anterior, ou seja, seu conteúdo total terá 3,5 x 10⁴ UFC no tubo contendo 10 mL.

Essa lógica é aplicada para todos os tubos anteriores e o cálculo final fica, conforme página seguinte.

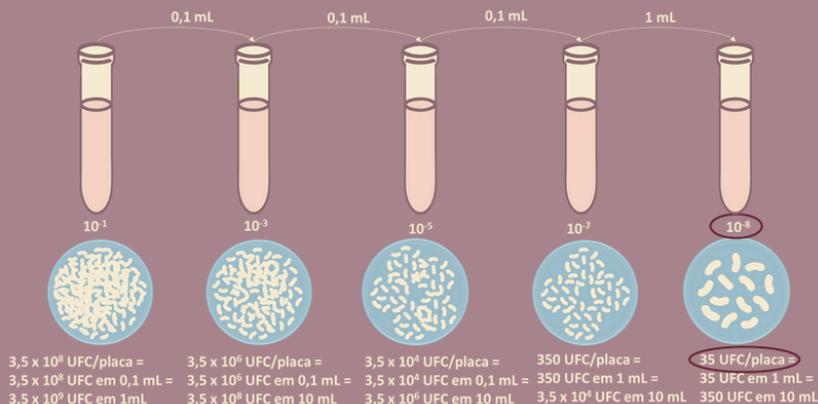
Na prática, como falamos, é mais fácil multiplicar o valor obtido pelo fator de diluição conforme formula abaixo:

$$\text{Concentração final} = 35 \times 10^8$$

$$\text{Concentração final} = 3,5 \times 10^9 \text{ UFC/mL}$$

DILUIÇÃO SERIADA

PASSO A PASSO PARA QUANTIFICAÇÃO



Portanto, a concentração final será de $3,5 \times 10^9$ UFC/ml

PERGUNTAS E RESPOSTAS

Posso utilizar suspensões armazenadas em geladeira por mais de 3 dias? É o tempo que levo para quantificar minha suspensão.

Resposta: Infelizmente, as farmacopéias preconizam o uso dentro de 24 horas a temperatura de 2 a 8°C ou 2 horas a temperatura ambiente. Se não consegue padronizar a suspensão inicial com as opções acima e ainda quer manter o uso da suspensão em geladeira, a melhor forma de amenizar a situação é validar a conservação, mostrando que a quantidade não se alterou após o tempo de armazenamento.

Apenas cuidado com auditores experientes pois essa prática pode não ser aceita. Já há estudos científicos mostrando que suspensões como *Staphylococcus aureus*, perde sua viabilidade após 12 horas mantida em refrigeração. Mesmo a quantidade se mantendo estável, você não conseguirá defender o estado da viabilidade da célula.

PASSO A PASSO

MEIOS QUANTITATIVOS

Para o meios quantitativos como TSA, SDA e R2A, os micro-organismos que serão utilizados serão os abaixo:

Micro-organismos	Referências
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538, NCIMB 9518, CIP 4.83, ou NBRC 13276
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118, or NBRC 13275
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633, NCIMB 8054, CIP 52.62, or NBRC 3134
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231, NCPF 3179, IP 48.72, or NBRC 1594
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404, IMI 149007, IP 1431.83, or NBRC 9455

PERGUNTAS E RESPOSTAS

Por que utilizamos 5 micro-organismos diferentes para esses meios? Posso utilizar apenas 3 deles?

Resposta: o uso de 5 micro-organismos tem como objetivo principal simular grupos de contaminantes, conforme abaixo. Usar menos tipos, não é recomendável, pois você não garante que seu meio está performando corretamente. Não é possível prever que tipo de contaminação pode acontecer no seu produto final ou matéria-prima e, portanto, limitar os tipos pode ser um apontamento em uma inspeção.

Staphylococcus aureus = gram positivo. Representante para contaminações de origem humana (pele)

Pseudomonas aeruginosa = gram negativo. Representante para contaminação por água ou veículos aquosos (formador de biofilme)

Bacillus subtilis = gram positivo esporulado. Representante de contaminações de materiais e solo

Candida albicans = levedura. Representante para contaminações humanas

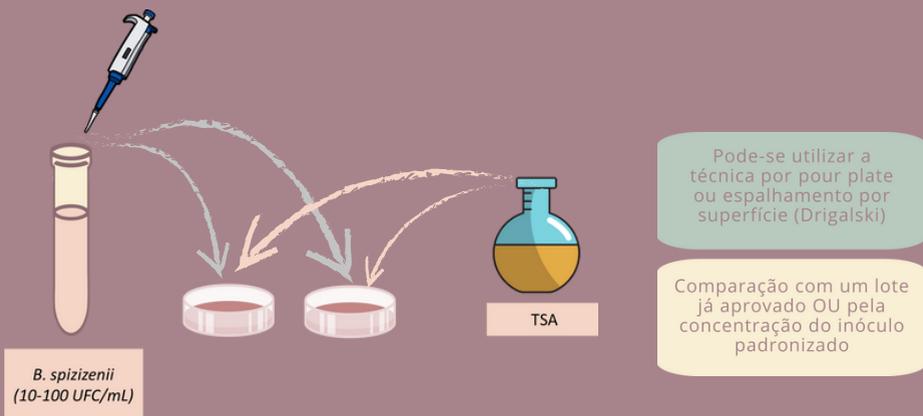
Aspergillus brasiliensis = fungo filamentosos. Representante de contaminantes do ambiente, encontrado em ambientes úmidos.

PASSO A PASSO

MEIOS QUANTITATIVOS

Agora que vimos como os micro-organismos são quantificados e o porquê devemos usar os 5 micro-organismos listados na farmacopéia é hora de colocar a mão na massa.

A figura abaixo ilustra como deve ser realizado a transferência de uma suspensão de *Bacillus spizizenii*. O teste deve ser feito sempre em duplicata e o meio aplicado pode ser pela técnica de espalhamento ou Pour plate.



A alíquota adicionada as placas pode variar de 0,1 a 1 ml dependendo de como foi feita a diluição seriada. Apenas uma dica para as alíquotas: 0,1 ml irá ter melhor absorção em técnicas de espalhamento, ganhando tempo de teste e melhor resultado.

Dessa forma, o mesmo deve ser realizado para os demais micro-organismos, conforme definido em farmacopeia. Os exemplos abaixo ilustram o teste para TSA e SDA.



Atenção para a temperatura de incubação para TSA para os micro-organismos *Candida albicans* e *Aspergillus brasiliensis*. São conhecidos por crescerem em temperatura mais baixa, mas o TSA é um meio não seletivo que possibilita o crescimento tanto de bactérias como fungos. Por isso, sua temperatura ainda é mais alta do que o usual.

PASSO A PASSO

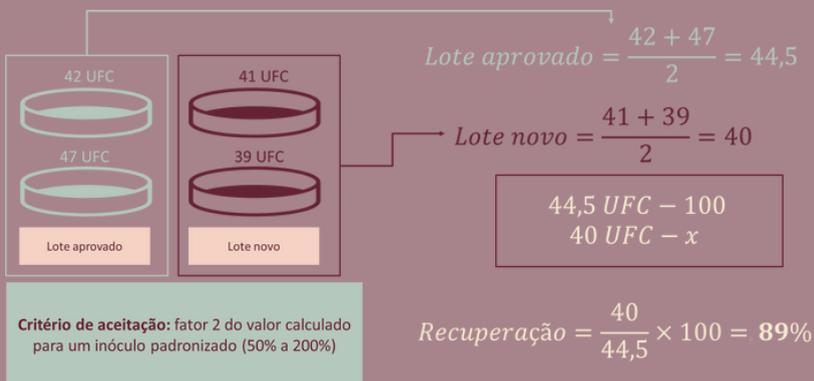
MEIOS QUANTITATIVOS

Como realizar a interpretação dos resultados: com o que irei compara meu resultado?

Conforme farmacopéias, o critério de aceitação é um fator 2 do valor calculado para um inóculo padronizado. Mas o que quer dizer esse fator 2?

O fator 2 nada mais é do que dividir seu resultado por 2 e multiplicar por 2, dando um faixa de aceitação entre 50 a 200%.

Vamos entender na prática como é isso:



A conta acima, portanto, obteve uma recuperação de 89%. Ou seja, apresentou uma recuperação de 89% em relação a um lote já validado. Como está dentro da faixa especificada e o lote estaria APROVADO!

Valores abaixo de 50% indicam inibição do meio, podendo ser ocasionado por erro em pH, diluição ou concentração do meio.

Valores acima de 200% indicam contaminação cruzada, sendo que o meio pode já estar contaminado.

PERGUNTAS E RESPOSTAS

O que fazer quando um lote de meio de cultura não passa no teste de promoção de crescimento?

Resposta: quando há falha na promoção e o lote já foi utilizado em uma análise de liberação de produto ou matéria-prima, deve-se reportar esse resultado como falha laboratorial (esse reporte pode variar de empresa para empresa, podendo ser chamado de Desvio analítico, Falha laboratorial ou Desvio de análise). Algumas empresas podem interpretar como um Desvio de Qualidade, mas devemos lembrar, que se há uma falha no meio, não é possível afirmar que o lote testado está bom ou ruim. O registro e a comunicação são sempre importantes! Comunique a equipe de Qualidade e faça o teste novamente, com um lote aprovado. Idealmente, os lotes de meios de cultura só devem ser usados após a liberação da Promoção de crescimento. Caso não tenha sido usado em nenhum ensaio, reporte o caso, descarte o lote e faça novamente.

Importante ter isso documentado em procedimento.

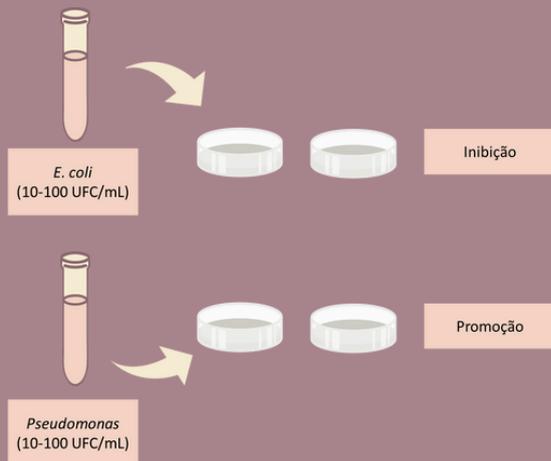
PASSO A PASSO

MEIOS SELETIVOS

Da mesma forma que os meios quantitativos, os meios seletivos utilizam micro-organismos alvos como os descritos abaixo. No entanto, eles possuem uma diferença importante, pois considerando sua característica seletiva, haverá testes com micro-organismos inibitórios para garantir a seletividade do meio de cultura.

Micro-organismo	Referência
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739, NCIMB 8545, CIP 53.126, or NBRC 3972
<i>Salmonella sp</i>	ATCC 14028
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118, or NBRC 13275
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538, NCIMB 9518, CIP 4.83, ou NBRC 13276
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231, NCPF 3179, IP 48.72, or NBRC 1594
<i>Burkholderia cepacia</i>	ATCC 25416, NCTC 10743, or CIP 80.24
<i>Burkholderia multivorans</i>	ATCC BAA-247, LMG 13010, CCUG 34080, CIP 105495, DSM 13243, or NCTC 13007
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	ATCC BAA-245 or LMG 16656

Vamos ver o exemplo para um teste utilizando o meio Cetrimide:



Nesse exemplo, a *Escherichia coli* age como um micro-organismo inibitório, ou seja, não deve apresentar crescimento na placa.

Já para a *Pseudomonas aeruginosa* que é o micro-organismo alvo, o crescimento característico deverá ser observado.

PASSO A PASSO

MEIOS SELETIVOS

As figuras abaixo ilustram as características de cada meio. Lembre-se de colocar imagens no seu procedimento de Promoção de Crescimento.

BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS

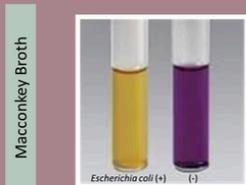


Meio de cultura	Propriedade	Micro-organismo	Resultado esperado
Caldo Mossel	Promoção de crescimento	<i>Escherichia coli</i>	Turvação e alteração de coloração de verde para amarelo a marrom
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Turvação, mas sem alteração de coloração de verde
	Inibição	<i>Staphylococcus aureus</i>	Sem turvação
VRBGA (Violet Red Bile Glucose Agar)	Promoção de crescimento + Indicativo	<i>Escherichia coli</i>	Colônias vermelhas a púrpura, com precipitação
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Crescimento homogêneo, sem diferenciação de coloração

Reference: USP-NF <62>



ESCHERICHIA COLI



Meio de cultura	Propriedade	Micro-organismo	Resultado esperado
Caldo MacConkey	Promoção de crescimento	<i>Escherichia coli</i>	Turvação do meio, com alteração de cor para amarela
	Inibição	<i>Staphylococcus aureus</i>	Sem turvação
Agar MacConkey	Promoção de crescimento + Indicativo	<i>Escherichia coli</i>	Crescimento de colônias purpuras, com precipitação em seu redor

Reference: USP <62>



PASSO A PASSO

MEIOS SELETIVOS

As figuras abaixo ilustram as características de cada meio. Lembre-se de colocar imagens no seu procedimento de Promoção de Crescimento.

SALMONELLA SP

Rappaport



Left: Uninoculated Tube (Control)
 Centre: *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 (H8 H)
 Right: *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 (H8 H)

Meio de cultura	Propriedade	Micro-organismo	Resultado esperado
Caldo Rappaport	Promoção de crescimento	<i>Salmonella Typhimurium</i> ou <i>Abony</i>	Turvação com alteração da cor de azul para branco leitoso
	Inibição	<i>Staphylococcus aureus</i>	Sem turvação
XLD	Promoção de crescimento + Indicativo	<i>Salmonella Typhimurium</i> ou <i>Abony</i>	Crescimento de colônias vermelhas com centro preto

Reference: USP <62>

100 uL



S. aureus

100 uL



RSVE

100 uL



Salmonella

100 uL



RSVE

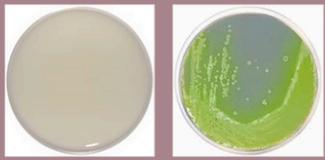


XLD

Incubação: 30-35°C
Período: 18-24 horas

PSEUDOMONAS AERUGINOSA E STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Cetrimide



Cetrimide Agar (-) *P. aeruginosa* (+)

Meio de cultura	Propriedade	Micro-organismo	Resultado esperado
Agar Cetrimide	Promoção de crescimento	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Colônias azul-esverdeado, fluorescente a luz UV
	Inibição	<i>Escherichia coli</i>	Sem crescimento
Agar Manitol	Promoção de crescimento + Indicativo	<i>Staphylococcus aureus</i>	Colônias amarelas, alteração da cor do meio para amarelo
	Inibição	<i>Escherichia coli</i>	Sem crescimento

Reference: USP <62>

100 uL



P. aeruginosa

100 uL



CET

100 uL



S. aureus

100 uL



MSA

100 uL



E. coli

100 uL



CET

100 uL



MSA

Incubação: 30-35°C
Período: 18-24 horas

Manitol



Manitol Agar (-) *S. aureus* (+)

PASSO A PASSO

MEIOS SELETIVOS

As figuras abaixo ilustram as características de cada meio. Lembre-se de colocar imagens no seu procedimento de Promoção de Crescimento.

CLOSTRIDIA

Columbia Caldo



Columbia Caldo (-)



C. Sporogenes (+)

Columbia Agar



Columbia Agar (-)



C. Sporogenes (+)

Meio de cultura	Propriedade	Micro-organismo	Resultado esperado
Reinforced Medium for Clostridia	Promoção de crescimento	<i>Clostridium sporogenes</i>	Colônias pequenas brancas e leitosas
Agar Columbia	Promoção de crescimento	<i>Clostridium Sporogenes</i>	Turvação do meio

Reference: USP <62>



CANDIDA ALBICANS

Sabouraud Caldo



Sabouraud Caldo (-)



C. albicans (+)

Meio de cultura	Propriedade	Micro-organismo	Resultado esperado
Agar Sabouraud Dextrose	Promoção de crescimento	<i>Candida albicans</i>	Turvação do meio
Caldo Sabouraud Dextrose	Promoção de crescimento + Indicativo	<i>Candida albicans</i>	Colônias médias, brancas e de aspecto cremoso

Reference: USP <62>

Sabouraud Agar



Sabouraud Agar (-)



C. albicans (+)



PASSO A PASSO

MEIOS SELETIVOS

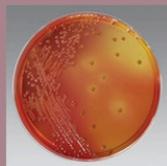
As figuras abaixo ilustram as características de cada meio. Lembre-se de colocar imagens no seu procedimento de Promoção de Crescimento.

BURKHOLDERIA CEPACIA COMPLEX

Burkholderia cepacia selective agar



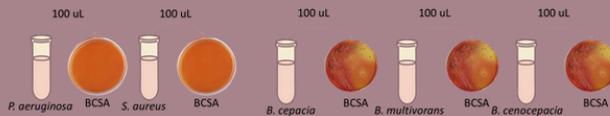
BCS Agar (-)



B. cepacia (+)

Meio de cultura	Propriedade	Micro-organismo	Resultado esperado
<i>Burkholderia selective cepacia agar</i>	Inibição	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sem crescimento
	Inibição	<i>Staphylococcus aureus</i>	Sem crescimento
	Promoção de crescimento	<i>Burkholderia cepacia</i>	Colônias amarelas a marrom, com alteração do meio para amarelo
	Promoção de crescimento	<i>Burkholderia multivorans</i>	
	Promoção de crescimento	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	

Reference: USP <60>



Incubação: 30-35°C
Período: 48 a 72 horas

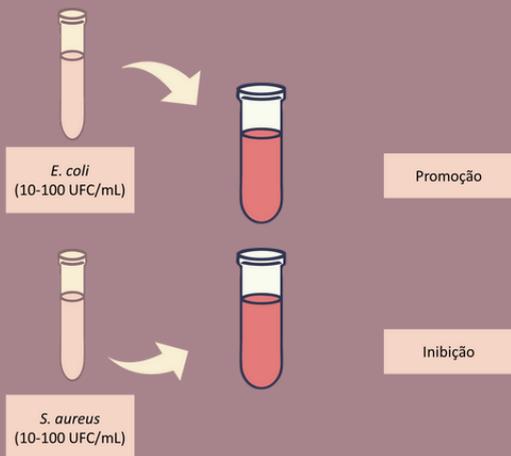
PASSO A PASSO

MEIOS CALDOS

Da mesma forma que os meios seletivos, os meios em caldo utilizam micro-organismos alvos como os descritos abaixo e também podem conter testes com micro-organismos inibitórios para garantir a seletividade do meio de cultura.

Micro-organismo	Referência
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739, NCIMB 8545, CIP 53.126, or NBRC 3972
<i>Salmonella sp</i>	ATCC 14028
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118, or NBRC 13275
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538, NCIMB 9518, CIP 4.83, ou NBRC 13276
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231, NCPF 3179, IP 48.72, or NBRC 1594
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633, NCIMB 8054, CIP 52.62, or NBRC 3134

Vamos ver o exemplo para um teste utilizando o meio caldo MacConkey:



Nesse exemplo, a *Escherichia coli* age como um micro-organismos alvo e deverá apresentar a alteração de cor e turbidez desejada.

Já para a *Staphylococcus aureus* que é o micro-organismo inibitório, não deverá apresentar turvação ou alteração de cor.

Não é necessário testar na quantidade de uso. Quantidades menores podem ser aplicadas para a promoção de crescimento

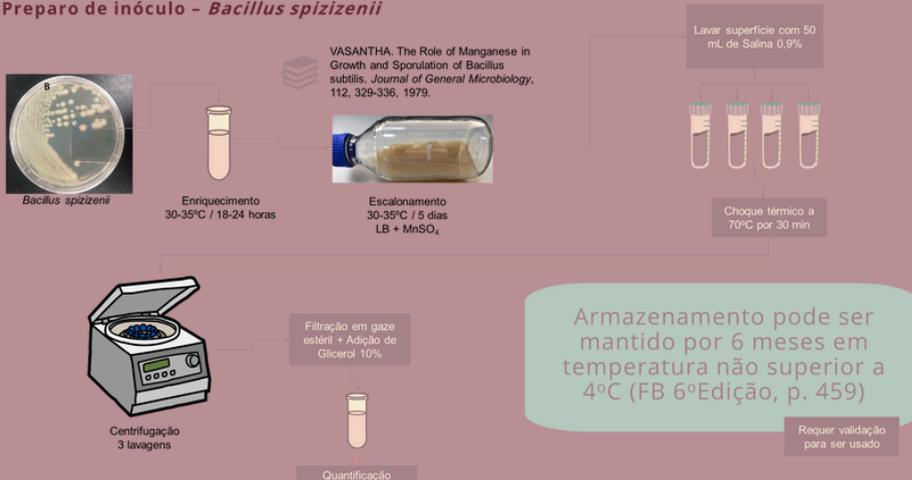
Comparação com um lote já aprovado, apenas da turvação. Não é necessário quantificar

PASSO A PASSO

SUSPENSÃO DE ESPOROS

Uma das opções para melhorar a recuperação de *Bacillus spizizenii* é utilizar uma suspensão pronta de esporos. O passo a passo abaixo foi extraído do capítulo de Doseamento de Antibióticos, da Farmacopéia Brasileira. Lembre de validar o processo abaixo, se decidir usá-lo na promoção de crescimento.

Preparo de inóculo - *Bacillus spizizenii*



PONTOS CRÍTICOS

Padronização do inóculo

Escolha um método que seja reprodutível mesmo que o analista não tenha experiência na função. Métodos com muita variação de resultados devem ser reavaliados.



Lotes testados

Sempre que gerado um novo lote é necessário realizar a promoção de crescimento. Assim como cada lote recebido deve ser testado (mesmo que o lote já tenha sido recebido previamente)



Crescimento de fungos e esporos

Aspergillus brasiliensis é um micro-organismo aeróbico. Cuidado no crescimento em tubo para permitir a aeração. Suspensão de micro-organismos esporulados: ideal que seja padronizado e preparado uma suspensão de esporos



PROMOÇÃO CRESCIMENTO CONCLUSÃO

Recapitulando:

Micro-organismos:

Definir forma de manipulação e diluição dos micro-organismos é fundamental para ter um padronização dos inóculos

Comparação dos lotes:

A comparação dos resultados pode ser feita por um lote já aprovado (mais recomendado) ou ainda por uma suspensão padronizada de inóculo

Cálculo de diluição:

Entender o cálculo de diluição é essencial para que os resultados sejam acurados e não haja perda de tempo ou ensaio

Lote a lote:

A promoção de crescimento deve ser feito a cada lote preparado e a cada recebimento (independente se o lote já foi recebido)





ACESSE NOSSOS
OUTROS
CONTEÚDOS

AGRADECEMOS SUA LEITURA

(19) 98110-5999

www.microphar.com.br

comercial@microphar.com.br