|  |  |
| --- | --- |
| TÍTULO: Preparo e Teste Simplificado para Detecção de Coliformes  | VERSÃO: 00 |
| **Elaborador:** Enfª. Rafaela Cristina de Souza | Dt elaboração: 24/01/2024 |
| **Aprovação da Gerência:** Enfº.Glauciléia de Souza Arbach | Dt aprov. Gerência: 27/01/2024 |
| **Revisor:** Enfº. André Luiz Baptista Reis | Dt revisão: 26/01/2024 |
|  |
| 1. DEFINIÇÃO  |
| E o ato de realizar a identificação de Coliformes Termotolerantes e Totais através do meio de cultura Caldo Verde Bile Brilhante (BGBL) que fermentam a lactose em 24/48 horas.  |
| 2. OBJETIVO  |
| Identificar a presença de coliformes nas amostras de frascos de leite humano ordenhado pasteurizado. |
| 3. INDICAÇÃO E CONTRAINDICAÇÃO  |
| **Indicação:** Todos os frascos de leite pasteurizado.**Contraindicação:** Não se aplica. |
| 4. EXECUTANTE |
| Enfermeiros, técnicos de enfermagem e Biólogo. |
| **5. ORIENTAÇÃO PRÉ-PROCEDIMENTO** |
| * Verificar a disponibilidade dos materiais que são utilizados no processo;
* Verificar a quantidade e validade do Caldo Verde Bile Brilhante (BGBL);
 |
| **6. DESCRIÇÃO DE MATERIAL**  |
| * EPIs – Equipamento de Proteção Individual (gorro, máscara, luvas de procedimento e óculos de proteção);
* Luva estéril;
 |
| * Capote estéril;
* Uma Seringa de 10 ou 20ml
* Pipetas;
* Pipetador;
* Tubo de vidro com tampa rosqueável com capacidade mínima de 15 mL;
* Tubos de Durham;
* Autoclave que permita operar por 121°C por 15 minutos;
* Estufa bacteriológica para cultura, regulada a 36°C, com exatidão de ± 1ºC;
* Balança semi-analítica com sensibilidade de 0,1g calibrada;
* Bico de Bunsen;
* Frasco para preparo de meio de cultura;
* Bastão de vidro;
* Frasco coletor de urina;
* Campo cirúrgico;
* Frasco de vidro com tampa de plástico;
* Fita adesiva para autoclave;
* Estante para suporte, revestida em PVC;
* Estante para suporte de metal;
* Pincel de marcador permanente
* Recipiente de plástico transparente;
* Gelo reciclável;
* Transofix®;
* Materiais e reagentes:

a. Caldo Verde Bile Brilhante simples (4% p/v) e concentrado (5% p/v); * b. Água destilada.
 |
| **7. DESCRIÇÃO DETALHADA DAS ATIVIDADES**  |
| * **1º momento: realizar o preparo do meio de cultura e reagente:**
1. Separar o material a ser utilizado no processo;
2. Lavar as mãos;
3. Paramentar com os EPIs;
4. Higienizar o frasco de água destilada e balança semi-analítica com gase embebida em álcool;
5. Pesar frasco coletor utilizando balança semi-analítica;
6. Tarar a balança;
7. Pesar 40g do meio de cultura Caldo Verde Bile em frasco (coletor de urina) utilizando balança semi-analítica;
8. Utilizar o transfixador no frasco de água destilada medindo 500ml no frasco para o preparo do meio de cultura;
9. Adicionar gradativamente água destilada, para a dissolução do meio de cultura, misturando com auxílio de bastão de vidro;
10. Homogeneizar todo o meio de cultura na água destilada;
11. Dispor a mistura em frasco de vidro apropriado;
12. Fechar o frasco deixando sua tampa a ¼ de volta para a sua esterilização;
13. Empacotar o frasco em um campo cirúrgico;
14. Passar a fita adesiva para autoclave em torno do campo;
15. Identificar: setor, data do preparo, validade e nome do funcionário responsável;
16. Esterilizar a 121°C durante 30 minutos;
* **2º momento: Acomodar o BGBL no tubo de ensaio:**
	1. Pegar o material na esterilização;
1. Verificar a fita de autoclave garantindo que o produto foi esterilizado;
	1. Lavar as mãos;
	2. Abrir o campo expondo o frasco de vidro com o BGBL;
	3. Abrir o campo expondo a estante de metal com os tubos de vidro;
	4. Abrir o grau cirúrgico com as tampas, colocando-as sem contaminar no campo aberto da estante de metal;
2. Abrir o grau cirúrgico com o capote e compressa;
3. Paramentar-se utilizando os EPIs;
4. Realizar a escovação cirúrgica das mãos;
5. Colocar o capote e luva estéril;
6. Distribuir 9 ml do meio de cultura nos tubos de vidro, com seringa;
7. Tampar os tubos contendo as amostras com o meio de cultura;
8. Fechar com o próprio campo em que se encontra a estante caso não utilize no momento;
9. Identificar com o nome da solução e a data da realização do produto;
10. Armazenar sob refrigeração a 5ºC, podendo permanecer por até 15 dias.
* **3º momento: Preparo das amostras para análise microbiológica:**
1. Retirar os tubos com o meio de cultura do refrigerador para que os mesmos possam entrar em equilíbrio com a temperatura ambiente;
2. Abrir o campo cirúrgico expondo a estante de metal com os tubos de ensaio com a solução de BGBL;
3. Verificar se os tubos de Durhan estão completamente imersos no meio de cultura e livres de bolhas de ar e depósitos de cristais em seu interior;
4. Paramentar-se com os EPIs;
5. Identificar os tubos de ensaio com BGBL com pincel marcador permanente com a numeração da planilha de acordo com os frascos de leite pasteurizado;
6. Abrir o tubo de ensaio;
7. Abrir o frasco de leite humano pasteurizado em campo de chama;
8. Coletar em campo de chama quatro alíquotas de 1 mL da amostra a ser analisada em pontos diferentes do frasco de leite humano pasteurizado;
9. Dispor todas as alíquotas de uma mesma amostra em um único tubo de cultura contendo BGBL 4%;
10. Tampar o frasco de leite humano pasteurizado em campo de chama;
11. Tampar os tubos contendo o leite com o meio de cultura;
12. Encaminhar as amostras ao laboratório para análise microbiológica.
 |
| **8. PONTOS CRÍTICOS/RISCOS**  |
| **Pontos Críticos**: * Calibragem da balança e estufa;
* Identificação dos tubos de acordo com os frascos;
 |
| **Risco:*** Quebra dos frascos e/ou pipetas;
* Acidente com material biológico;
 |
| **9. CUIDADOS PÓS-PROCEDIMENTO**  |
| * Preencher a planilha própria com a identificação dos fracos pasteurizados;
* Encaminhar as amostras até o laboratório;
* Incubá-los a 36°C durante 24 a 48 horas, em estufa.
 |
| **10. RESULTADOS ESPERADOS**  |
| Garantir que os frascos de leite humano estejam livre de Coliforme Totais e termotolerantes. |
| **11. REGISTROS** |
| Identificar na planilha própria todos os tubos de ensaio. (enumerando cada mãe / amostra); |
| 12. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA  |
| Norma Técnica BLH-IFF/NT 11.21: Higiene e Conduta: Funcionários e BLH-IFF/NT.Norma Técnica BLH-IFF/NT 40.2: Controle de Qualidade Microbiológico - Teste Simplificado para Detecção de Coliformes Totais. |
| **13. ANEXO** |
|  |

|  |  |
| --- | --- |
| **Elaborador:** Enfº. Rafaela Cristina de Souza |  |
| **Revisor:** Enfº. André Luiz Baptista Reis  |  |
| **Aprovação:** Glauciléia de Souza Arbach |  |