



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
Paulo Fernando Santos de Lacerda
TRADUTOR PÚBLICO JURAMENTADO E INTÉRPRETE COMERCIAL
Inglês - Francês - Espanhol - Português

Doc no. 3509(001)

p. 1

EU, ABAIXO ASSINADO, TRADUTOR PÚBLICO JURAMENTADO E INTÉRPRETE COMERCIAL, NOMEADO PELO EXMO.SR. PRESIDENTE DA JUNTA COMERCIAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO (JUCERJA), NOS IDIOMAS INGLÊS, FRANCÊS E ESPANHOL, COM MATRÍCULA NÚMERO 243, CERTIFICO E DOU FÉ PÚBLICA QUE NESTA DATA ME FOI APRESENTADO UM (01) DOCUMENTO ORIGINAL LAVRADO EM LÍNGUA INGLESA, E QUE AGORA TRADUZO PARA O IDIOMA PORTUGUÊS, NO MELHOR DE MEU CONHECIMENTO, DE BOA FÉ E PRÁTICA DE MEU OFÍCIO, DE ACORDO COM O VERNÁCULO, A SEGUIR ABAIXO: -----

9223 TESTE DE COLIFORMES DO SUBSTRATO DE ENZIMAS* -----

**Aprovado pelo Standard Methods Committee, 2016. -----*

*Grupo de Trabalho Conjunto: Jennifer Best (presidente),
Bennie L. Cockerel, Jr., Gil Dichter, Nancy H. Hall,
William W. Northeimer, Viola Reynolds e Helena Solo-
Gabriele. -----*

9223 A. Introdução -----

Os testes de substrato de enzimas utilizam substratos cromogênicos e fluorogênicos hidrolisáveis para detectar simultaneamente enzimas produzidas por coliformes totais e *Escherichia coli* (*E. coli*). Neste método, as bactérias de coliformes totais produzem a enzima β -D-galactosidase, que adere ao substrato cromogênico no meio para liberar cromogênio. A maioria das cepas de *E. coli* produz a enzima β -glucuronidase, que adere a um substrato fluorogênico no meio para liberar fluorogênio. A liberação de cromogênio indica que bactérias de coliformes estão presentes, e a liberação de fluorogênio indica que bactérias de *E. coli* estão presentes. -----

Formatos de tubos múltiplos, poços múltiplos, ou de presença-ausência (amostra simples de 100 ml) estão disponíveis para uso com esses testes de substrato de enzima. -----

Paulo Fernando de Lacerda
Tradutor Público e intérprete comercial





REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
Paulo Fernando Santos de Lacerda
TRADUTOR PÚBLICO JURAMENTADO E INTÉRPRETE COMERCIAL
Inglês - Francês - Espanhol - Português

Doc no. 3509(001)

p. 2

1. Princípio

a. Bactérias de coliformes totais: Os meios Colilert®, Colilert-18®, e Colisure® utilizam os substratos cromogênicos orto-nitrofenil-β-D-galactopiranosida (ONPG) e clorofenol vermelho-β-D-galactopiranoside (CPRG), respectivamente, para detectar a enzima β-D-galactosidase, que é produzida por bactérias de coliformes totais. A enzima f3-D-galactosidase hidrolisa o substrato cromogênico que produz uma mudança de cor, indicando desse modo a presença de coliformes totais sem procedimentos adicionais. Embora as bactérias não coliformes (ex: as espécies Aeromonas, Flavobac-terium, e Pseudomonas) possam produzir pequenas quantidades da enzima β-D-galactosidase, o crescimento desses organismos é suprimido, de modo que eles geralmente não produzirão um resultado falso positivo, a menos que >106 CFU/100 ml estejam presentes.

b. Escherichia coli: O substrato fluorogênico 4-metil-umbel-liferil-β-D-glucuronido (MUG) é usado para detectar a enzima β-D-glucuronidase, que é produzida pela maioria das cepas de *E. coli*. A enzima β-D-glucuronidase hidrolisa o substrato fluorogênico que produz fluorescência azulada quando é visto sob luz ultravioleta (UV) de comprimento de onda longo (365-366 nm). Juntos, a cor muda (devido à 13-o-galactosidase) e a fluorescência (devido à f3-o-glucuronidase) indicam que uma amostra contém *E. coli*. ---
Grandes quantidades de algumas bactérias ou cepas de bactérias (ex: algumas cepas de Shigella e Salmonella spp.) podem fazer uma amostra ter fluorescência mas não mudará a cor da mesma, pois falta a elas a 13-o-galactosidase. Essas amostras seriam consideradas negativas para *E. coli*. -----

Paulo Fernando de Lacerda
Tradutor Público e Intérprete comercial



TJPB





REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
Paulo Fernando Santos de Lacerda
TRADUTOR PÚBLICO JURAMENTADO E INTÉRPRETE COMERCIAL
Inglês – Francês – Espanhol – Português

Doc no. 3509(001)

p. 3

2. Aplicações -----

Esses testes de coliformes de substrato de enzima são recomendados para a análise de amostras de água potável, água de mananciais, água de lençol freático e águas residuais. Se um laboratório não tiver usado esse método antes, é preferível conduzir testes paralelos (incluindo variações sazonais) com o método existente para avaliar a eficácia específica do local e para comparar resultados. Os resultados de muitos estudos de desempenho de métodos estão disponíveis na literatura, e os índices de resultados falso positivos e falso negativos diferem entre os diversos meios. Os usuários devem selecionar cuidadosamente o meio e o procedimento que melhor atende às suas necessidades. Ver a orientação sobre validação de novos métodos na Seção 9020B.11. -----

Amostras de água contendo material húmico ou outro material podem ser coloridas. Se houver uma cor de fundo natural, observe qual é. Se a água estiver suficientemente amarela para ser mal-interpretada como um positivo fraco após a incubação, utilize um meio que não fique amarelo (ex: Colisure). O alto teor de cálcio-sal de algumas águas pode causar precipitação, mas isso não deverá afetar a reação. Em amostras com excesso de cloro, um clarão azul poderá ser visto durante a adição de agentes Colilert ou Colilert-18. Se isso ocorrer, considere a amostra inválida e interrompa os testes. -----

Não utilizar o teste do substrato de enzimas para confirmar culturas presumíveis de coliformes ou colônias de membrana-filtro, pois o substrato pode estar sobrecarregado pelo pesado inóculo de não coliformes fracos produtores de β -D-

Paulo Fernando de Lacerda
Tradutor Público e Intérprete Comercial

Confira os dados do ato em: <https://selodigital.tjpb.jus.br> ou Consulte o Documento em: <https://azevedobastos.not.br/documento/69832901216084259336>



CARTÓRIO
Autenticação Digital Código: 69832901216084259336-3
Data: 29/01/2021 12:42:36
Valor Total do Ato: R\$ 4,66
Selo Digital Tipo Normal C: ALC53295-8PXP;



Cartório Azevêdo Bastos
Av. Presidente Epitácio Pessoa - 1145
Bairro dos Estado, João Pessoa - PB
(83) 3244-5404 - cartorio@azevedobastos.not.br
<https://azevedobastos.not.br>

Valber Azevêdo de M. Cavalcanti
Titular

TJPB



O presente documento digital foi conferido com o original e assinado digitalmente por MARCELO TIMOTEO DE OLIVEIRA, em sexta-feira, 29 de janeiro de 2021 12:42:02 GMT-03:00, CNS: 06.870-0 - 1º OFÍCIO DE REGISTRO CIVIL DAS PESSOAS NATURAIS E TABELIONATO DE NOTAS/PB, nos termos da medida provisória N. 2.200-2 de 24 de agosto de 2001. Sua autenticidade deverá ser confirmada no endereço eletrônico www.cenad.org.br/autenticidade. O presente documento digital pode ser convertido em papel por meio de autenticação no Tabelionato de Notas. Provimento nº 100/2020 CNJ - artigo 22.



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
Paulo Fernando Santos de Lacerda
TRADUTOR PÚBLICO JURAMENTADO E INTÉRPRETE COMERCIAL
Inglês – Francês – Espanhol – Português

Doc no. 3509(001)

p. 4

galactosidase, causando resultados falso positivos.-----

9223 B. Teste do Substrato de Enzimas-----

1. Amostras-----

Coletar amostras como é orientado na Seção 9060A, usando recipientes para amostras especificados na Seção 9030B.19. Ao coletar amostras de água clorada, utilize tiossulfato de sódio conforme a descrição na Seção 9060A.2. Siga as orientações de controle de qualidade (CQ) para as garrafas de amostra descritas na Seção 9020B.5d. Obedeça aos tempos de retenção de amostra e condições descritas na Seção 9060B ou exigida pelos regulamentos. Tenha cuidado de assegurar que as amostras sejam mantidas na temperatura adequada e analisadas o mais breve possível após serem coletadas, pois a inobservância dessa advertência pode comprometer os resultados. Assegure que as amostras atendem aos critérios de aceitação do laboratório no recebimento.-----

2. Controle de Qualidade-----

Os usuários do método devem seguir as orientações de garantia de qualidade (GQ/CQ) da Seção 9020, incluindo, mas sem limitação, CQ analítico (Seção 9020B.9), instrumentação/equipamentos (Seções 9020B.4 e 9030B), e suprimentos (Seção 9020B.5). Ver procedimentos de CQ principais na Tabela 9020:I.-----

Antes de usar cada lote de agente novo, verifique o desempenho do mesmo através de organismos de controle positivos e negativos. Para conduzir controles de cultura, inocule o agente com três bactérias de controle: *E. coli*,

Paulo Fernando de Lacerda
Tradutor Público e intérprete comercial





REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
Paulo Fernando Santos de Lacerda
TRADUTOR PÚBLICO JURAMENTADO E INTÉRPRETE COMERCIAL
Inglês - Francês - Espanhol - Português

Doc no. 3509(001)

p. 5

uma cepa de coliformes totais diferente de *E. coli* (ex: *Enterobacter cloacae*), e um não coliforme (ver Tabela 9020:VI). Um controle negativo não inoculado deve ser analisado também. Além disso, testar o agente e os recipientes (garrafas, bandejas com poços múltiplos, tubos) para confirmar a esterilidade e falta de autofluorescência.

3. Agentes de Substrato

Os agentes Colilert, Colilert-18, e Colisure estão disponíveis comercialmente* em pacotes medidos previamente para teste de presença-ausência ou em tubos descartáveis para uso em um formato de múltiplos tubos. Os formatos Quanti-Tray e Quanti-Tray/2000* são formatos de múltiplos tubos que podem ser usados com os pacotes medidos previamente para quantificar as bactérias coliformes presentes em uma amostra.

Guardar os agentes de acordo com as orientações e usar os mesmos antes de sua data de vencimento. Evitar exposição prolongada dos agentes à luz solar direta. Descartar agentes que mudaram de cor, aspecto, e/ou textura (os agentes são higroscópicos e criam touceiras se forem expostos à umidade).

* Fornecido por IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME.

4. Procedimento

Começar a análise misturando a amostra corretamente para promover a distribuição uniforme as bactérias. Para que a mistura correta ocorra, as amostras devem ter espaço livre ≥ 1 -pol. e serem agitadas vigorosamente por 7 s (para frente e para trás 1 pé aproximadamente 25 vezes).

Paulo Fernando de Lacerda
Tradutor Público e intérprete comercial

O presente documento digital foi conferido com o original e assinado digitalmente por MARCELO TIMOTEO DE OLIVEIRA, em sexta-feira, 29 de janeiro de 2021 12:42:02 GMT-03:00, CNS: 06.870-0 - 1º OFÍCIO DE REGISTRO CIVIL DAS PESSOAS NATURAIS E TABELIONATO DE NOTAS/PB, nos termos da medida provisória N. 2.200-2 de 24 de agosto de 2001. Sua autenticidade deverá ser confirmada no endereço eletrônico www.cenad.org.br/autenticidade. O presente documento digital pode ser convertido em papel por meio de autenticação no Tabelionato de Notas. Provimento nº 100/2020 CNJ - artigo 22.



TJPB





REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
Paulo Fernando Santos de Lacerda
TRADUTOR PÚBLICO JURAMENTADO E INTÉRPRETE COMERCIAL
Inglês – Francês – Espanhol – Português

Doc no. 3509(001)

p. 6

A não observação de misturar corretamente a amostra pode levar a resultados errôneos, pois se sabe que as bactérias se agrupam, e portanto, elas não se distribuem homogeneamente por toda a amostra. Por exemplo, os resultados de número mais provável (MPN) se baseiam em uma distribuição de Poisson (aleatória) de células na amostra; a inobservância de misturar corretamente a amostra antes da análise resultará em um valor MPN que subestima a densidade bacteriana real. Remover uma fração da amostra sem fazer a mistura correta, como ocorre durante a realização de análises de presença-ausência com uma só garrafa (uma garrafa usada tanto para coletar como para analisar a amostra), pode resultar em resultados falso negativos se os organismos alvo tiverem sido agrupados e removidos da garrafa sem serem homogeneizados. -----

Se a garrafa não tiver espaço livre suficiente para a mistura adequada, derrame a amostra em um recipiente estéril maior para que ela possa ser misturada corretamente. Meça o volume desejado da amostra e prossiga com a análise. -----

Para cada agente ou formato usado, os testes devem ser colocados na incubadora dentro de 30 minutos após o agente ser adicionado à amostra. Independentemente do formato usado, todos os agentes devem ser incubados à temperatura de $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. O agente Colilert deve ser incubado por ≥ 24 h, e o agente Colilert-18 deve ser incubado por ≥ 18 h, e o agente Colisure deve ser incubado por ≥ 24 h. -----

Os testes de coliformes descritos neste trabalho foram desenvolvidos para obter crescimento bacteriano ideal nas temperaturas indicadas de incubação. A inobservância de manter essa temperatura por toda a incubação pode resultar em resultados falso negativos, especialmente com os

Paulo Fernando de Lacerda
Tradutor Público e Intérprete Comercial





REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
Paulo Fernando Santos de Lacerda
TRADUTOR PÚBLICO JURAMENTADO E INTÉRPRETE COMERCIAL
Inglês - Francês - Espanhol - Português

Doc no. 3509(001)

p. 7

períodos mais curtos de incubação para o agente Colilert-18. Para assegurar que as amostras estejam na temperatura correta por todo o período de incubação, os laboratórios devem pré-aquecer as amostras após adicionar o agente, mas antes de colocá-los na incubadora. -----

Para pré-aquecer uma amostra de teste, coloque-a em um banho de água a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 20 minutos ou em um banho de água de $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ por 7 a 10 minutos para levá-la até a temperatura de incubação. O laboratório pode precisar conduzir estudos de carga para determinar por quanto tempo as amostras precisam ser incubadas para um preaquecimento eficaz (depende da quantidade de amostras a serem incubadas). O preaquecimento é desnecessário se o formato de Bandeja Quanti for usado. -----

a. Procedimento de presença-ausência (P/A): Acrescentar de forma asséptica o conteúdo do pacote contendo o agente medido previamente a 100 ml de amostra em uma garrafa ou recipiente de vidro de borossilicato estéril, transparente e não fluorescente ou equivalente. Tampar assepticamente e agitar vigorosamente para dissolver o agente. Parte do agente pode permanecer não dissolvida mas isso não irá afetar o desempenho do teste. -----

b. Procedimento de tubos múltiplos: -----

1) Procedimento de tubos múltiplos usando um teste MPN de 5 ou 10 tubos; uma série de 5 tubos (20 ml de amostra por tubo) ou série de 10 tubos (10 ml de amostra por tubo) pode ser usada quando for esperado que os níveis de bactérias sejam razoavelmente baixos ou um volume fixo de 100 ml de amostra precisar ser analisado (ex: para conformidade regulamentar). -----

Adicionar um pacote medido previamente de agente a uma amostra de água de 100 ml bem misturada em um recipiente, e

Paulo Fernando de Lacerda
Tradutor Público e intérprete comercial



CNJ: 06.870-0

TJPB





REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
Paulo Fernando Santos de Lacerda
TRADUTOR PÚBLICO JURAMENTADO E INTÉRPRETE COMERCIAL
Inglês - Francês - Espanhol - Português

Doc no. 3509(001)

p. 8

agitar vigorosamente para dissolver o agente. Arrumar os tubos em fileiras de 5 ou 10 em um suporte de tubos de teste, e rotular cada jogo de tubos. Colocar assepticamente 20 ml de amostra em cada um dos 5 tubos estéreis ou 10 ml dentro de cada um dos 10 tubos estéreis, tampar firmemente, e misturar vigorosamente para dissolver o agente. Se estiver usando 10 tubos que já contêm agente medido previamente (fornecido pelo fabricante), colocar assepticamente 10 ml de amostra dentro de cada tubo. -----

Algumas partículas de agentes podem permanecer não dissolvidas; isso não afetará o desempenho do teste. ----- Após a incubação, recorra às Tabelas 9221:II e III para determinar o MPN de coliformes totais e *E. coli* presentes.

2). Procedimento de tubos múltiplos usando teste MPN de 15 tubos - normalmente, um teste de 15 tubos inclui três diluições em série de uma amostra, com cada diluição inoculada dentro de 5 tubos. Normalmente, 5 tubos contêm amostra não diluída, 5 contêm uma diluição de 1:10, e 5 contêm uma diluição de 1:100. -----

Use essa técnica quando uma amostra de água puder conter níveis de bactérias mais altos e não houver necessidade de analisar um volume fixo (ex: ao analisar águas não potáveis). A quantidade de tubos e volumes de amostra selecionados depende da qualidade e das características da água a ser examinada. Para impedir qualquer interação indesejada com o agente, use apenas água estéril, não tamponada e isenta de oxidantes (ex: água deionizada ou destilada) para preparar as diluições. -----

Ao trabalhar com amostras diluídas, a melhor prática de laboratório é assegurar que todos os tubos estejam no lugar e rotulados antes da análise começar. Além disso, usar pipetas limpas e esterilizadas para pipetar cada diluição,

Tradutor Público e intérprete comercial



TJPB





REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
Paulo Fernando Santos de Lacerda
TRADUTOR PÚBLICO JURAMENTADO E INTÉRPRETE COMERCIAL
Inglês - Francês - Espanhol - Português

Doc no. 3509(001)

p. 9

pois o transporte bacteriano de pipetas sujas irá tornar os resultados dos testes inexatos. -----

a) Usando tubos descartáveis contendo agente medido previamente (fornecidos pelo fabricante). -----

i) Preparando amostra para a série não diluída - Pipetar assepticamente 10 ml de amostra bem misturada em cada um dos 5 tubos contendo agente colocada previamente. Tampar os tubos e misturar vigorosamente para dissolver o agente. ---
ii) Preparando diluição de 1:10 - Pipetar assepticamente 10 ml de amostra bem misturada em um recipiente esterilizado contendo 90 ml de água esterilizada, não tamponada e isenta de oxidantes (ex: água deionizada ou destilada). Misturar bem. Pipetar assepticamente 10 ml dessa diluição em cada um dos 5 tubos contendo agente colocado previamente. Tampar os tubos e misturar vigorosamente até dissolver o agente. ----
iii) Preparando diluição de 1:100 - Pipetar assepticamente 10 ml de amostra bem misturada da diluição 1:10 em um recipiente esterilizado contendo 90 ml de água esterilizada, não tamponada e isenta de oxidantes (ex: água deionizada ou destilada). Misturar bem. Pipetar assepticamente 10 ml dessa diluição em cada um dos 5 tubos contendo agente colocado previamente. Tampar os tubos e misturar vigorosamente até dissolver o agente. -----

b) Usando pacotes de agente medido previamente -----

i) Preparando amostra para a série não diluída - Adicionar um pacote de agente medido previamente a um recipiente esterilizado contendo 100 ml de amostra bem misturada, e misturar vigorosamente para dissolver o agente. Pipetar assepticamente 10 ml de amostra ou mistura de agente em cada um dos 5 tubos esterilizados e não fluorescentes. ---

ii) Preparando diluições de 1:10 e 1:100 - Adicionar um pacote de agente medido previamente a 100 ml de água

Paulo Fernando de Lacerda
Tradutor Público e Intérprete Comercial



CARTÓRIO

Autenticação Digital Código: 69832901216084259336-9
Data: 29/01/2021 12:42:36
Valor Total do Ato: R\$ 4,66
Selo Digital Tipo Normal C: ALC53301-0PXB;



CNJ: 06.870-0

Cartório Azevêdo Bastos
Av. Presidente Epitácio Pessoa - 1145
Bairro dos Estado, João Pessoa - PB
(83) 3244-5404 - cartorio@azevedobastos.not.br
<https://azevedobastos.not.br>

Válber Azevêdo de M. Cavalcanti
Titular

TJPB





REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
Paulo Fernando Santos de Lacerda
TRADUTOR PÚBLICO JURAMENTADO E INTÉRPRETE COMERCIAL
Inglês - Francês - Espanhol - Português

Doc no. 3509(001)

p. 10

esterilizada, não tamponada e isenta de oxidante (ex: água deionizada ou destilada) em um recipiente esterilizado, e misturar vigorosamente até dissolver o agente. Pipetar assepticamente 9 ml de agente preparado em 10 tubos esterilizados e não fluorescentes. Essa preparação do agente de substrato de enzimas deve ser concluída ≤ 1 h da adição da amostra ao agente preparado. -----

iii) Inoculando tubos para diluição 1:10 - Pipetar assepticamente 1 ml de amostra bem misturada dentro de cada um dos 5 tubos contendo 9 ml de agente preparado. Tampar e misturar bem. -----

iv) Inoculando tubos para diluição 1:100 - Pipetar 10 ml de amostra bem misturada em um recipiente contendo 90 ml de água esterilizada, não tamponada e isenta de oxidante (ex: água deionizada ou destilada). Fechar e misturar bem até dissolver o agente. Pipetar assepticamente 1.0 ml dessa amostra diluída em 5 tubos contendo 9 ml de agente preparado. Tampar e misturar bem. -----

TABELA 9223:I. MUDANÇA DE CORES PARA DIVERSOS AGENTES

Substrato	Positivo para Coliformes Totais	Positivo para <i>E. coli</i>	Resultado Negativo
Colilert® Colilert-18®	Amarelo	Fluorescência azul	Sem cor ou cor mais clara do que o comparador /sem fluorescência
Colisure®	Vermelho ou magenta	Fluorescência azul	Amarelo, cor de rosa ou laranja/sem fluorescência

Para todas as diluições adicionais necessárias, continuar com o processo de diluição descrito acima. -----

Após a incubação, usar a Tabela 9221:IV para determinar o MPN tanto para coliformes totais como *E. coli*. Se diluições adicionais tiverem sido formadas previamente, o valor MPN

Paulo Fernando de Lacerda
Tradutor Público e Intérprete Comercial

O presente documento digital foi conferido com o original e assinado digitalmente por MARCELO TIMOTEO DE OLIVEIRA, em sexta-feira, 29 de janeiro de 2021 12:42:02 GMT-03:00, CNS: 06.870-0 - 1º OFÍCIO DE REGISTRO CIVIL DAS PESSOAS NATURAIS E TABELIONATO DE NOTAS/PB, nos termos da medida provisória N. 2.200-2 de 24 de agosto de 2001. Sua autenticidade deverá ser confirmada no endereço eletrônico www.cenad.org.br/autenticidade. O presente documento digital pode ser convertido em papel por meio de autenticação no Tabelionato de Notas. Provimento nº 100/2020 CNJ - artigo 22.

Confira os dados do ato em: <https://selodigital.tjpb.jus.br> ou Consulte o Documento em: <https://azevedobastos.not.br/documento/69832901216084259336>



CARTÓRIO
Autenticação Digital Código: 69832901216084259336-10
Data: 29/01/2021 12:42:36
Valor Total do Ato: R\$ 4,66
Selo Digital Tipo Normal C: ALC53302-22GV;



Cartório Azevêdo Bastos
Av. Presidente Epitácio Pessoa - 1145
Bairro dos Estados, João Pessoa - PB
(83) 3244-5404 - cartorio@azevedobastos.not.br
<https://azevedobastos.not.br>

Válber Azevêdo de M. Cavalcanti
Titular

TJPB





REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
Paulo Fernando Santos de Lacerda
TRADUTOR PÚBLICO JURAMENTADO E INTÉRPRETE COMERCIAL
Inglês – Francês – Espanhol – Português

Doc no. 3509(001)

p. 11

deve ser multiplicado pelo fator de diluição para obter os resultados quantitativos adequados. -----

c. Procedimento de poços múltiplos: Esse procedimento é executado com bandejas de poços múltiplos descartáveis e esterilizadas [a Quanti-Tray (51 poços) ou Bandeja Quanti/2000]. Acrescentar assepticamente o agente medido previamente do pacote a uma amostra de 100 ml de água em um recipiente e agitar vigorosamente, para dissolver o agente. Para abrir a bandeja Quanti-Tray, use uma mão para segurar a unidade verticalmente (com o lado do poço virado para a palma da mão) e apertar a parte superior da bandeja, de modo que ela se curve na direção da palma da mão. Puxar suavemente a aba de folha metalizada da bandeja, tendo cuidado para não tocar no interior da folha metálica ou bandeja. Acrescentar mistura de amostra de reagente-água diretamente à bandeja, evitando o contato com a aba de folha metálica. Bater de leve nos pequenos poços (Quanti-Tray/2000) 2 a 3 vezes para liberar as bolhas de ar que estiverem presas. Deixar a espuma assentar, embora um pouco de espuma seja aceitável. Colocar a bandeja dentro do inserto de borracha adequado com o lado do poço (plástico) virado para baixo, e alimentar a mesma na seladora da Quanti-Tray. A seladora dispersa a amostra nos poços e veda o pacote. -----

5. Interpretação -----

a. Bactérias de coliformes totais: A enzima bacteriana β -D-galactosidase hidrolisa ONPG (agentes Colilert e Colilert-18) para produzir uma cor amarela e hidrolisa CPRG (agente Colisure) para produzir uma cor vermelha ou magenta. Após o período mínimo de incubação, examinar a mudança adequada de

Paulo Fernando de Lacerda
Tradutor Público e intérprete comercial

Confira os dados do ato em: <https://selodigital.tjpb.jus.br> ou Consulte o Documento em: <https://azevedobastos.not.br/documento/69832901216084259336>



CARTÓRIO
Autenticação Digital Código: 69832901216084259336-11
Data: 29/01/2021 12:42:36
Valor Total do Ato: R\$ 4,66
Selo Digital Tipo Normal C: ALC53303-W5TI;



CNJ: 06.870-0

Cartório Azevêdo Bastos
Av. Presidente Epitácio Pessoa - 1145
Bairro dos Estado, João Pessoa - PB
(83) 3244-5404 - cartorio@azevedobastos.not.br
<https://azevedobastos.not.br>

Valber Azevêdo de M. Cavalcanti
Titular

TJPB



O presente documento digital foi conferido com o original e assinado digitalmente por MARCELO TIMOTEO DE OLIVEIRA, em sexta-feira, 29 de janeiro de 2021 12:42:02 GMT-03:00, CNS: 06.870-0 - 1º OFÍCIO DE REGISTRO CIVIL DAS PESSOAS NATURAIS E TABELIONATO DE NOTAS/PB, nos termos da medida provisória N. 2.200-2 de 24 de agosto de 2001. Sua autenticidade deverá ser confirmada no endereço eletrônico www.cenad.org.br/autenticidade. O presente documento digital pode ser convertido em papel por meio de autenticação no Tabelionato de Notas. Provimento nº 100/2020 CNJ - artigo 22.



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
Paulo Fernando Santos de Lacerda
TRADUTOR PÚBLICO JURAMENTADO E INTÉRPRETE COMERCIAL
Inglês - Francês - Espanhol - Português

Doc no. 3509(001)

p. 12

cores (Tabela 9223:I). Se a resposta da cor não for uniforme por toda a amostra, misturar por inversão antes de fazer a leitura. -----

Usar um comparador de cores não vencido (fornecido pelo fabricante) para assegurar que os resultados de teste com agentes Colilert e Colilert-18 são lidos de forma precisa. O comparador usado deve ter o mesmo volume no mesmo tipo de recipiente que a amostra. -----

1) Colilert - Se a cor da amostra for mais amarela, ou mais amarelo escura do que o comparador, então ela é positiva para coliformes totais. Em caso negativo, a amostra é negativa para coliformes totais. -----

Entretanto, se a resposta cromogênica for ambígua (a cor não puder ser determinada) após 24 h, deve-se incubar a amostra por até 4 horas mais, para deixar a cor do teste se intensificar. Se a cor não ficar tão amarela ou mais amarela do que o comparador dentro desse período, então a amostra é positiva para coliformes totais. Em caso negativo, amostra é negativa para coliformes totais. -----

O agente Colilert pode ser incubado por < 28 horas. Após 28 h, os resultados de teste negativos ainda são considerados válidos, mas os resultados positivos não. -----

2) Colilert-18 - Se a cor da amostra for tão amarela ou mais amarela do que o comparador, então ela é positiva para coliformes totais. Em caso negativo, a amostra é negativa para coliformes totais. -----

Entretanto, se a resposta cromogênica for ambígua (a cor não puder ser determinada) após 18 h, deve-se incubar a amostra por até 4 horas mais, para deixar a cor do teste se intensificar. Se a cor não ficar tão amarela quanto, ou mais amarelo escura do que a cor do comparador dentro desse

Tradutor Público e Intérprete Comercial





REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
Paulo Fernando Santos de Lacerda
TRADUTOR PÚBLICO JURAMENTADO E INTÉRPRETE COMERCIAL
Inglês – Francês – Espanhol – Português

Doc no. 3509(001)

p. 13

período, então a amostra é positiva para coliformes totais. Em caso negativo, a amostra é negativa para coliformes totais. -----

Colilert-18 pode ser incubado por ≤ 22 h. Após 22 h, os resultados de teste negativo ainda são considerados válidos, mas os resultados negativos não são. -----

3) Colisure - Se a amostra tiver cor vermelha ou magenta, ela é positiva para coliformes totais. Se a resposta cromogênica for questionável (a cor pode ser laranja ou cor de rosa) após 14 horas, deve-se incubar a amostra por até mais 24 h para deixar a cor de teste se intensificar. Se a cor não ficar vermelha ou magenta dentro desse período, então a amostra é positiva para coliformes totais. -----

Os testes com agente Colisure ficam amarelos após o agente ser adicionado; se a cor não mudar para vermelho ou magenta após a incubação, então a amostra é negativa para coliformes totais. -----

O agente Colisure pode ser incubado por ≤ 48 h. Após 48 h, os resultados não são válidos. -----

Às vezes, o teor elevado de cálcio-sal de uma amostra pode causar precipitação, mas isso não afetará a reação. Entretanto, se o agente de teste ficar com uma cor inadequada (ex: verde ou preto) que interfira com a leitura do resultado do teste, outro método deve ser usado. -----

b. *Escherichia coli*: O substrato fluorogênico MUG é hidrolisado pela enzima bacteriana β -D-glucuronidase para produzir uma fluorescência azulada ao ser vista sob luz ultravioleta com comprimento de onda longo (365-366 nm). A mudança de cor (indicando que a β -D-galactosidase está ativa) e fluorescência (indicando que a β -D-glucuronidase está ativa) juntas mostram que *E. coli* está presente. -----

Após o período mínimo de incubação, examinar se há uma

Paulo Fernando de Lacerda
Tradutor Público e Intérprete Comercial





REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
Paulo Fernando Santos de Lacerda
TRADUTOR PÚBLICO JURAMENTADO E INTÉRPRETE COMERCIAL
Inglês - Francês - Espanhol - Português

p. 14

Doc no. 3509(001)

fluorescência azulada nos testes positivos de coliformes totais, usando uma luz ultravioleta de comprimento de onda longo (365-366 nm) com uma lâmpada de 6 W e mantê-la dentro de 5 pol. da amostra em ambiente escuro. Usar um comparador de cores (fornecido pelo fabricante) antes da data de vencimento para assegurar que os resultados do teste sejam lidos com precisão. O comparador usado deve ter o mesmo volume no mesmo tipo de recipiente que a amostra. -----

1) Colilert - Se a amostra tiver uma fluorescência azulada igual ou superior àquela de um comparador positivo para coliformes totais, então ela é positiva para *E. coli*. Se a fluorescência for indefinida (não puder ser determinada) após 24 h, a amostra pode ser incubada por até mais 4 horas para deixar a fluorescência aumentar. Se a fluorescência da amostra não aumentar para ficar igual a, ou maior do que aquela do comparador dentro desse período, então a amostra é positiva para *E. coli*. -----

Se a fluorescência da amostra continuar inferior àquela do comparador após 28 h de incubação, então ela é negativa para *E. coli*. Amostras que forem negativas para bactérias de coliformes totais são negativas também para *E. coli*. ---

2) Colilert-18 - Se a amostra tiver uma fluorescência azulada igual ou superior àquela de um comparador positivo para coliformes totais, então ela é positiva para *E. coli*. Se a fluorescência for indefinida (não puder ser determinada), a amostra pode ser incubada por até mais 4 horas para deixar a fluorescência aumentar. Se a fluorescência da amostra não aumentar para ficar igual a, ou maior do que aquela do comparador dentro desse período, então a amostra é positiva para *E. coli*. Se a fluorescência continuar menor do que a do comparador após 22 h de incubação, então ela é negativa para *E. coli*. Amostras que

Paulo Fernando de Lacerda
Tradutor Público e intérprete comercial



CNJ: 06.870-0

TJPB





REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
Paulo Fernando Santos de Lacerda
TRADUTOR PÚBLICO JURAMENTADO E INTÉRPRETE COMERCIAL
Inglês - Francês - Espanhol - Português

Doc no. 3509(001)

p. 15

forem negativas para bactérias de coliformes totais são negativas também par *E. coli*.-----

3) Colisure - Se uma amostra positiva para coliformes totais tiver fluorescência, então ela é positiva para *E. coli*. Se a fluorescência for indefinida (não puder ser determinada), a amostra deve ser incubada por até mais 24 h para deixar a fluorescência aumentar. Se a amostra claramente tiver fluorescência dentro desse período, então ela é positiva para *E. coli*.-----

Se a amostra não tiver fluorescência após h de incubação, então ela é negativa para *E. coli*. Amostras que forem negativas para bactérias de coliformes totais são também negativas para *E. coli*.-----

6. Reportando-----

Para o procedimento de presença-ausência, reportar os resultados como coliformes totais e *E. coli* presentes ou ausentes em uma amostra de 100 ml.-----

Para o procedimento de tubos múltiplos, calcular o valor MPN para coliformes totais e *E. coli* a partir da quantidade de tubos positivos, como descreve a Seção 9221C.-----

Para o procedimento de poços múltiplos, determine o MPN pelas tabelas de MPN adequadas obtidas do fabricante de bandejas.-----

7. Bibliografia-----

EDBERG, S.C., M.J. ALLEN, D.B. SMITH & THE NATIONAL COLLABORATIVE STUDY. 1988. National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous enumeration

Paulo Fernando de Lacerda
Tradutor Público e intérprete comercial

O presente documento digital foi conferido com o original e assinado digitalmente por MARCELO TIMOTEO DE OLIVEIRA, em sexta-feira, 29 de janeiro de 2021 12:42:02 GMT-03:00, CNS: 06.870-0 - 1º OFÍCIO DE REGISTRO CIVIL DAS PESSOAS NATURAIS E TABELIONATO DE NOTAS/PB, nos termos da medida provisória N. 2.200-2 de 24 de agosto de 2001. Sua autenticidade deverá ser confirmada no endereço eletrônico www.cenad.org.br/autenticidade. O presente documento digital pode ser convertido em papel por meio de autenticação no Tabelionato de Notas. Provimento nº 100/2020 CNJ - artigo 22.

Confira os dados do ato em: <https://selodigital.tjpb.jus.br> ou Consulte o Documento em: <https://azevedobastos.not.br/documento/69832901216084259336>



CARTÓRIO
Autenticação Digital Código: 69832901216084259336-15
Data: 29/01/2021 12:42:37
Valor Total do Ato: R\$ 4,66
Selo Digital Tipo Normal C: ALC53307-TUBN;



Cartório Azevêdo Bastos
Av. Presidente Epitácio Pessoa - 1145
Bairro dos Estado, João Pessoa - PB
(83) 3244-5404 - cartorio@azevedobastos.not.br
<https://azevedobastos.not.br>

Válber Azevêdo de M. Cavalcanti
Titular

TJPB





REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
Paulo Fernando Santos de Lacerda
TRADUTOR PÚBLICO JURAMENTADO E INTÉRPRETE COMERCIAL
Inglês - Francês - Espanhol - Português

Doc no. 3509(001)

p. 16

of total coliforms and Escherichia coli from drinking water: Comparison with the standard multiple tube fermentation method. Appl. Environ. Microbiol. 54:1595. ---
EDBERG, S.C. & M.M. EDBERG. 1988. A defined substrate technology for the enumeration of microbial indicators of environmental pollution. Yale J. Biol. Med. 61:389. -----
COVERT, T.C., L.C. SHADIX, E.W. RICE, J.R. HAINES & R.W. FREYBERG. 1989. Evaluation of the Autoanalysis Colilert test for detection and enumeration of total coliforms. Appl. Environ. Microbiol. 55:2443. -----
EDBERG, S.C., M.J. ALLEN, D.B. SMITH & THE NATIONAL COLLABORATIVE STUDY. 1989. National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous detection of total coliforms and Escherichia coli from drinking water: Comparison with presence-absence techniques. Appl. Environ. Microbiol. 55:1003. -----
EDBERG, S.C. & D.B. Swim. 1989. Absence of association between total heterotrophic and total coliform bacteria from a public water supply. Appl. Environ. Microbiol. 55:380. -----
U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 1989. National Primary Drinking Water Regulations: Analytical techniques; Coliform Bacteria; Final Rule. 40 CFR Part 141; Fed. Reg. 54:29998. -----
EDBERG, S.C., M.J. ALLEN, D.B. SMITH & N.J. Krtz. 1990. Enumeration of total coliforms and Escherichia coli from source water by the defined substrate technology. Appl. Environ. Microbiol. 56:366. -----
RICE, E.W., M.J. ALLEN & S.C. EDBERG. 1990. Efficacy of β -glucuronidase assay for identification of Escherichia coli by the defined-substrate technology. Appl. Environ. Microbiol. 56:1203. -----

Paulo Fernando de Lacerda
Tradutor Público e Intérprete Comercial

Confira os dados do ato em: <https://selodigital.tjpb.jus.br> ou Consulte o Documento em: <https://azevedobastos.not.br/documento/69832901216084259336>



CARTÓRIO
Autenticação Digital Código: 69832901216084259336-16
Data: 29/01/2021 12:42:37
Valor Total do Ato: R\$ 4,66
Selo Digital Tipo Normal C: ALC53308-ARU9;



Cartório Azevêdo Bastos
Av. Presidente Epitácio Pessoa - 1145
Bairro dos Estado, João Pessoa - PB
(83) 3244-5404 - cartorio@azevedobastos.not.br
<https://azevedobastos.not.br>

CNJ: 06.870-0

Valber Azevêdo de M. Cavalcanti
Titular

TJPB



O presente documento digital foi conferido com o original e assinado digitalmente por MARCELO TIMOTEO DE OLIVEIRA, em sexta-feira, 29 de janeiro de 2021 12:42:02 GMT-03:00, CNS: 06.870-0 - 1º OFÍCIO DE REGISTRO CIVIL DAS PESSOAS NATURAIS E TABELIONATO DE NOTAS/PB, nos termos da medida provisória N. 2.200-2 de 24 de agosto de 2001. Sua autenticidade deverá ser confirmada no endereço eletrônico www.cenad.org.br/autenticidade. O presente documento digital pode ser convertido em papel por meio de autenticação no Tabelionato de Notas. Provimento nº 100/2020 CNJ - artigo 22.



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
Paulo Fernando Santos de Lacerda
TRADUTOR PÚBLICO JURAMENTADO E INTÉRPRETE COMERCIAL
Inglês - Francês - Espanhol - Português

Doc no. 3509(001)

p. 17

EDBERG, S.C., M.J. ALLEN & D.B. SMITH. 1991. Defined substrate technology method for rapid and simultaneous enumeration of total coliforms and Escherichia coli from water: Collaborative study. J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 74:526. -----
EDBERG, S.C., F. LUDWIG & D.B. SMITH. 1991. The Colilert® System for Total Coliforms and Escherichia coli. Amer. Water Works Assoc. Res. Found., Denver, Colo. -----
RICE, E.W., M.J. ALLEN, D.J. BRENNER & S.C. EDBERG. 1991. Assay for β -glucuronidase in species of the genus Escherichia and its application for drinking water analysis. Appl. Environ. Microbiol. 57:592. -----
SHADIX, L.C. & E.W. RICE. 1991. Evaluation of β -glucuronidase assay for the detection of Escherichia coli from environmental waters. Can. J. Microbiol. 37:908. ----
COVERT, T.C., E.W. RICE, S.A. JOHNSON, D. BERMAN, C.H. JOHNSON & P.M. MASON. 1992. Comparing defined-substrate coliform tests for the detection of Escherichia coli in water. J. Amer. Water Works Assoc. 84(5):98. -----
MCCARTY, S.C., J.H. STANDRIDGE & M.C. STASIAK. 1992. Evaluating a commercially available defined-substrate test for recovery of chlorine-treated Escherichia coli. J. Amer. Water Works Assoc. 84(5):91. -----
U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 1992. National Primary Drinking Water Regulations: Analytical techniques; Coliform Bacteria; Final Rule, 40 CFR Part 141; Fed. Reg. 57:24744. -----
CLARK, J.A. & A.H. SHAARAWI. 1993. Evaluation of commercial presence-absence test kits for detection of total coliforms, Escherichia coli, and other indicator bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 59:380. -----
U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 1994. National

Paulo Fernando de Lacerda
Tradutor Público e Intérprete Comercial



CNJ: 06.870-0

TJPB





REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
Paulo Fernando Santos de Lacerda
TRADUTOR PÚBLICO JURAMENTADO E INTÉRPRETE COMERCIAL
Inglês – Francês – Espanhol – Português

Doc no. 3509(001)

p. 18

Primary and Secondary Drinking Water Regulation: Analytical methods for regulated drinking water contaminants; Final Rule. 40 CFR Parts 141 & 143; Fed. Reg. 59:62456. -----
McFETERS, G.A., S.C. BROADWAY, B.H. PYLE, M. PICKETT & Y. EGOZY. 1995. Comparative performance of Colisure™ and accepted methods in the detection of chlorine-injured total coliforms and *E. coli*. Water Sci. Technol. 31:259. -----

**E NADA MAIS HAVENDO A SER TRADUZIDO DESTE DOCUMENTO ACIMA,
ENCERRO A MESMA TRADUÇÃO, APONDO COM MINHA MÃO DIREITA MINHA
ASSINATURA NESTA DATA.** -----

São Paulo, 22 de março de 2018. -----

Paulo Fernando de Lacerda
Tradutor Público e intérprete comercial



$$TC/100 \text{ mL} = \frac{\text{number of fluorescent colonies} + \text{number of blue, non-fluorescent colonies (if any)}}{\text{volume of sample filtered (mL)}} \times 100$$

e. Coliform verification: For drinking water, total coliform colony verification is not required. For waters other than drinking water, verify at a frequency established by the laboratory (see Section 9020B.10). Laboratories may incorporate more stringent QC measures (e.g., verify at least one colony from each typical or atypical colony type from a given membrane filter culture, verify 10% of positive samples) based on need and sample type (see Section 9020B.10). Adjust counts based on verification results. Verification tests are listed in 9222B.4g.

4. Calculation of Coliform Density

See 9222B.5.

9223 ENZYME SUBSTRATE COLIFORM TEST*

9223 A. Introduction

Enzyme substrate tests use hydrolyzable chromogenic and fluorogenic substrates to simultaneously detect enzymes produced by total coliforms and *Escherichia coli* (*E. coli*). In this method, total coliform bacteria produce the enzyme β -D-galactosidase, which cleaves the chromogenic substrate in the medium to release chromogen. Most *E. coli* strains produce the enzyme β -glucuronidase, which cleaves a fluorogenic substrate in the medium to release fluorogen. The release of chromogen indicates that coliform bacteria are present, and the release of fluorogen indicates that *E. coli* are present.

Multiple-tube, multi-well, or presence-absence (single 100-mL sample) formats are available for use with these enzyme substrate tests.

1. Principle

a. Total coliform bacteria: Colilert®, Colilert-18®, and Colisure® media use the chromogenic substrates ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) and chlorophenol red- β -D-galactopyranoside (CPRG), respectively, to detect the enzyme β -D-galactosidase, which is produced by total coliform bacteria. The β -D-galactosidase enzyme hydrolyzes the chromogenic substrate that produces a color change, thereby indicating the presence of total coliforms without additional procedures.

Although non-coliform bacteria (e.g., *Aeromonas*, *Flavobacterium*, and *Pseudomonas* species) may produce small amounts of the enzyme β -D-galactosidase, the growth of these organisms is suppressed so they generally will not produce a false-positive result unless $>10^6$ CFU/100 mL are present.

b. Escherichia coli: The fluorogenic substrate 4-methyl-umbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG) is used to detect the enzyme β -D-glucuronidase, which is produced by most strains of *E. coli*. The

5. Bibliography

- BRENNER, K.P., C.C. RANKIN, Y.R. ROYBAL, G.N. STELMA, JR., P.V. SCARPINO & A.P. DUFOR. 1993. New medium for the simultaneous detection of total coliforms and *Escherichia coli* in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:3534.
- BRENNER, K.P., C.C. RANKIN, N. SIVAGANESAN & P.V. SCARPINO. 1996. Comparison of the recoveries of *Escherichia coli* and total coliforms from drinking water by the MI agar method and the U.S. Environmental Protection Agency-approved membrane filter method. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:204.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 2002. Method 1604: Total Coliforms and *Escherichia coli* in Water by Membrane Filtration Using a Simultaneous Detection Technique (MI Medium); EPA 821-R-02-024. Off. Water, Washington, D.C.

β -D-glucuronidase enzyme hydrolyzes the fluorogenic substrate that produces bluish fluorescence when viewed under long-wavelength (365–366 nm) ultraviolet (UV) light. Together, the color change (due to β -D-galactosidase) and the fluorescence (due to β -D-glucuronidase) indicate that a sample contains *E. coli*.

Large numbers of some bacteria or strains of bacteria (e.g., some strains of *Shigella* and *Salmonella* spp.) may cause a sample to fluoresce but will not change its color because they lack β -D-galactosidase. Such samples would be considered negative for *E. coli*.

2. Applications

These enzyme substrate coliform tests are recommended for the analysis of drinking water, source water, groundwater, and wastewater samples. If a laboratory has not used this method before, it is desirable to conduct parallel testing (including seasonal variations) with the existing method to assess site-specific effectiveness and to compare results. The results of many method-performance studies are available in the literature and the rates of false-positive and -negative results differ among various media. Users should carefully select the medium and procedure that best fits their needs. See Section 9020B.11 for guidance on validating new methods.

Water samples containing humic or other material may be colored. If there is a natural background color, note what it is. If the water is yellow enough to be misinterpreted as a weak positive after incubation, use a medium that does not turn yellow (e.g., Colisure). Some waters' high calcium-salt content can cause precipitation, but this should not affect the reaction. In samples with excessive chlorine, a blue flash may be seen while adding Colilert or Colilert-18 media. If this occurs, consider sample invalid and discontinue testing.

Do not use the enzyme substrate test to verify presumptive coliform cultures or membrane-filter colonies, because the substrate may be overloaded by the heavy inoculum of weak β -D-galactosidase-producing noncoliforms, causing false-positive results.

* Approved by Standard Methods Committee, 2016.

Joint Task Group: Jennifer Best (chair), Bennie L. Cockerel, Jr., Gil Dichter, Nancy H. Hall, William W. Norheimer, Viola Reynolds, Helena Solo-Gabriele.



9223 B. Enzyme Substrate Test

1. Samples

Collect samples as directed in Section 9060A, using sample containers specified in Section 9030B.19. When collecting chlorinated water samples, use sodium thiosulfate as described in Section 9060A.2. Follow the quality control (QC) guidelines for sample bottles described in Section 9020B.5d. Adhere to sample holding times and conditions as described in Section 9060B or required by regulations. Take care to ensure that samples are held at the appropriate temperature and analyzed as soon as possible after sample collection because failure to do so could compromise results. Ensure that samples meet laboratory acceptance criteria upon receipt.

2. Quality Control

Method users must adhere to the quality assurance (QA)/QC guidelines in Section 9020, including, but not limited to, analytical QC (Section 9020B.9), instrumentation/equipment (Sections 9020B.4 and 9030B), and supplies (Section 9020B.5). Refer to Table 9020.I for key QC procedures.

Before using each lot of new medium, verify its performance via positive and negative control organisms. To conduct culture controls, inoculate medium with three control bacteria: *E. coli*, a total coliform strain other than *E. coli* (e.g., *Enterobacter cloacae*), and a noncoliform (see Table 9020.VI). An uninoculated negative control should also be analyzed. In addition, test medium and vessels (bottles, multi-well trays, tubes) to confirm sterility and lack of autofluorescence.

3. Substrate Media

Colilert, Colilert-18, and Colisure media are available commercially* in premeasured packets for presence-absence testing or in disposable tubes for use in a multiple-tube format. The Quanti-Tray® and Quanti-Tray/2000® are multi-well formats that may be used with the premeasured packets to quantitate the coliform bacteria present in a sample.

Store media according to directions and use before expiration date. Avoid prolonged exposure of media to direct sunlight. Discard media that have changed color, appearance, and/or texture (media are hygroscopic and will clump and darken if exposed to moisture).

4. Procedure

Begin analysis by mixing the sample properly to promote even distribution of bacteria. For proper mixing to occur, samples should have ≥ 1 -in. headspace and be shaken vigorously for 7 s (back and forth 1 ft approximately 25 times).

Failure to properly mix sample can lead to erroneous results, as bacteria are known to clump together and are therefore not homogeneously distributed throughout sample. For instance, most probable number (MPN) results are based on a Poisson

(random) distribution of cells in the sample; failure to properly mix sample before analysis will result in an MPN value that underestimates actual bacterial density. Removing a portion of sample without proper mixing—such as when performing presence-absence analyses with a single bottle (one bottle used to both collect and analyze sample)—may result in false negative results if the target organisms were clumped together and removed from the bottle without being homogenized.

If the bottle lacks enough headspace for adequate mixing, pour sample into a larger sterile vessel so it can be mixed properly. Measure out desired sample volume and proceed with analysis.

For each medium or format used, tests should be placed in the incubator within 30 min after medium is added to sample. No matter which format is used, all media must be incubated at $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Colilert medium must be incubated for ≥ 24 h, Colilert-18 medium must be incubated for ≥ 18 h, and Colisure medium must be incubated for ≥ 24 h.

The coliform tests described here have been developed to obtain optimal bacterial growth at the indicated incubation temperatures. Failure to maintain this temperature throughout incubation could result in false negative results, especially with the shorter incubation times for Colilert-18. To ensure that samples are at proper temperature for the entire incubation period, laboratories should pre-warm samples after adding medium but before placing them in the incubator.

To pre-warm a test sample, place it in a $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$ water bath for 20 min or in a $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ waterbath for 7 to 10 min to bring it to incubation temperature. The laboratory may need to conduct load studies to determine how long samples need to be incubated for effective pre-warming (depends on number of samples being incubated). Pre-warming is unnecessary if the Quanti-Tray format is used.

a. *Presence-absence procedure (P/A)*: Aseptically add contents of packet containing premeasured medium to a 100-mL sample in a sterile, transparent, non-fluorescent borosilicate glass or equivalent bottle or container. Aseptically cap and shake vigorously to dissolve medium. Some medium may remain undissolved, but this will not affect test performance.

b. *Multiple-tube procedure*:

1) Multiple-tube procedure using a 5- or 10-tube MPN test—A 5-tube series (20 mL sample per tube) or 10-tube series (10 mL sample per tube) can be used when bacteria levels are anticipated to be fairly low or a fixed 100-mL sample volume must be analyzed (e.g., for regulatory compliance).

Add a premeasured packet of medium to a well-mixed 100-mL water sample in a container and shake vigorously to dissolve medium. Arrange tubes in rows of 5 or 10 in a test tube rack, and label each set of tubes. Aseptically dispense 20 mL sample into each of 5 sterile tubes or 10 mL into each of 10 sterile tubes, cap tightly, and mix vigorously to dissolve medium. If using 10 tubes already containing premeasured medium (available from manufacturer), aseptically dispense 10 mL sample into each tube.

Some medium particles may remain undissolved; this will not affect test performance.

After incubation, refer to Tables 9221.II and III to determine the MPN of total coliforms and *E. coli* present.

* Available from IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME.



2) Multiple-tube procedure using 15-tube MPN test—A 15-tube test typically involves three serial dilutions of a sample, with each dilution inoculated into 5 tubes. Typically, 5 tubes contain undiluted sample, 5 contain a 1:10 dilution, and 5 contain a 1:100 dilution.

Use this technique when a water sample may contain higher bacteria levels and there is no requirement to analyze a fixed volume (e.g., when analyzing nonpotable waters). The number of tubes and sample volumes selected depend on the quality and characteristics of the water to be examined. To preclude any unwanted interaction with the medium, use only sterile, non-buffered, oxidant-free water (e.g., deionized or distilled water) to prepare dilutions.

When working with diluted samples, best laboratory practice is to ensure that all tubes are in place and labeled before analysis begins. Additionally, use clean, sterile pipets to pipet each dilution because bacterial carryover from dirty pipets will make test results inaccurate.

a) Using disposable tubes containing premeasured medium (available from manufacturer)

i) Preparing sample for the undiluted series—Aseptically pipet 10 mL of well-mixed sample into each of 5 tubes containing predispensed medium. Cap tubes and mix vigorously to dissolve medium.

ii) Preparing 1:10 dilution—Aseptically pipet 10 mL of well-mixed sample into a sterile vessel containing 90 mL of sterile, non-buffered, oxidant-free water (e.g., deionized or distilled water). Mix well. Aseptically pipet 10 mL of this dilution into each of 5 tubes containing pre-dispensed medium. Cap tubes and mix vigorously to dissolve medium.

iii) Preparing 1:100 dilution—Aseptically pipet 10 mL of well-mixed sample from the 1:10 dilution into a sterile vessel containing 90 mL of sterile, non-buffered, oxidant-free water (e.g., deionized or distilled water). Mix well. Aseptically pipet 10 mL of this dilution into each of 5 tubes containing pre-dispensed medium. Cap tubes and mix vigorously to dissolve medium.

b) Using packets of premeasured medium

i) Preparing sample for the undiluted series—Add one packet of premeasured medium to a sterile vessel containing 100 mL of well-mixed sample, and mix vigorously to dissolve medium. Aseptically pipet 10 mL of sample/medium mixture into each of 5 sterile, non-fluorescing tubes.

ii) Preparing 1:10 and 1:100 dilutions—Add one packet of premeasured medium to 100 mL sterile, non-buffered, oxidant-free water (e.g., deionized or distilled water) in a sterile container, and mix vigorously to dissolve medium. Aseptically pipet 9 mL of prepared medium into 10 sterile, non-fluorescing tubes. This preparation of enzyme substrate medium must be completed ≤ 1 h of adding sample to prepared medium.

iii) Inoculating tubes for 1:10 dilution—Aseptically pipet 1 mL of well-mixed sample into each of 5 tubes containing 9 mL of prepared medium. Cap and mix well.

iv) Inoculating tubes for 1:100 dilution—Pipet 10 mL of well-mixed sample into a vessel containing 90 mL sterile, non-buffered, oxidant-free water (e.g., deionized or distilled water). Close and mix well to dissolve medium. Aseptically pipet 1.0 mL of this diluted sample into 5 tubes containing 9 mL of prepared medium. Cap and mix well.

TABLE 9223:I. COLOR CHANGES FOR VARIOUS MEDIA

Substrate	Total Coliform Positive	<i>E. coli</i> Positive	Negative Result
Colilert® Colilert-18®	Yellow	Blue fluorescence	Colorless or color lighter than the comparator/no fluorescence
Colisure®	Red or magenta	Blue fluorescence	Yellow, pink, or orange/no fluorescence

For any additional dilutions needed, continue with the dilution process as described above.

After incubation, use Table 9221:IV to determine the MPN for both total coliforms and *E. coli*. If further dilutions were performed, the MPN value must be multiplied by the dilution factor to obtain the proper quantitative results.

c. *Multi-well procedure*: This procedure is performed with sterilized disposable multi-well trays [either the Quanti-Tray (51 well) or Quanti-Tray/2000]. Aseptically add premeasured medium from packet to a 100-mL water sample in a container and shake vigorously to dissolve medium. To open Quanti-Tray, use one hand to hold unit upright (with the well side facing the palm) and squeeze the upper part of the tray so it bends toward the palm. Gently pull foil tab to separate foil from tray, being careful not to touch the inside of either foil or tray. Add reagent-water sample mixture directly into tray, avoiding contact with foil tab. Gently tap the small wells (Quanti-Tray/2000) 2 to 3 times to release any air bubbles that may be trapped. Allow foam to settle, although some foam is acceptable. Place tray into the appropriate rubber insert with the well (plastic) side facing down, and feed it into the Quanti-Tray sealer. The sealer disperses the sample into the wells and seals the package.

5. Interpretation

a. *Total coliform bacteria*: The bacterial enzyme β -D-galactosidase hydrolyzes ONPG (Colilert and Colilert-18) to yield a yellow color and hydrolyzes CPRG (Colisure) to yield a red or magenta color. After the minimum incubation period, examine for the appropriate color change (Table 9223:I). If color response is not uniform throughout sample, mix by inversion before reading.

Use an unexpired color comparator (available from manufacturer) to ensure that Colilert and Colilert-18 test results are read accurately. The comparator used must have the same volume in the same type of container as the sample.

1) Colilert—If sample color is as yellow as or darker yellow than the comparator, then it is positive for total coliforms. If not, then the sample is negative for total coliforms.

However, if the chromogenic response is ambiguous (color cannot be discerned) after 24 h, incubate sample for up to 4 h longer to allow test color to intensify. If the color does become as yellow as or darker than that of the comparator within this period, then the sample is positive for total coliforms. If not, then the sample is negative for total coliforms.

Colilert can be incubated for ≤ 28 h. After 28 h, negative test results are still considered valid, but positive results are not.

2) Colilert-18—If sample color is as yellow as or darker yellow than the comparator, then it is positive for total coliforms. If not, then it is negative for total coliforms.



However, if the chromogenic response is ambiguous (color cannot be discerned) after 18 h, incubate sample for up to 4 h longer to allow the test color to intensify. If the color does become as yellow as or darker than that of the comparator within this period, then the sample is positive for total coliforms. If not, then the sample is negative for total coliforms.

Colilert-18 can be incubated for ≤ 22 h. After 22 h, negative test results are still considered valid, but positive results are not.

3) Colisure—If the sample has a red or magenta color, it is positive for total coliforms. If the chromogenic response is questionable (color may be orange or pink) after 24 h, incubate sample for up to 24 h longer to allow test color to intensify. If color does become red or magenta within this period, then the sample is positive for total coliforms.

Colisure tests turn yellow after medium is added; if color does not change to red or magenta after incubation, then the sample is negative for total coliforms.

Colisure can be incubated for ≤ 48 h. After 48 h, results are not valid.

Sometimes a sample's high calcium-salt content can cause precipitation, but this will not affect the reaction. However, if the test medium turns an inappropriate color (e.g., green or black) that interferes with test-result reading, another method must be used.

b. Escherichia coli: The fluorogenic substrate MUG is hydrolyzed by the bacterial enzyme β -D-glucuronidase to yield a bluish fluorescence when viewed under long-wavelength (365–366 nm) UV light. The color change (indicating β -D-galactosidase is active) and fluorescence (indicating β -D-glucuronidase is active) together show that *E. coli* is present.

After the minimum incubation period, examine positive total coliform tests for a bluish fluorescence; use a long-wavelength (365–366 nm) UV lamp with a 6-W bulb and hold it within 5 in. of sample in a dark environment. Use a color comparator (available from the manufacturer) before its expiration date to ensure that test results are read accurately. The comparator used must have the same volume in the same type of container as the sample.

1) Colilert—If the sample has a bluish fluorescence equal to or greater than that of a total-coliform-positive comparator, then it is positive for *E. coli*. If the fluorescence is ambiguous (cannot be discerned) after 24 h, the sample may be incubated for up to 4 h longer to allow the fluorescence to intensify. If sample fluorescence does intensify to equal to or greater than that of the comparator within this period, then the sample is positive for *E. coli*.

If sample fluorescence remains less than that of the comparator after 28 h of incubation, then it is negative for *E. coli*. Samples that are negative for total coliform bacteria are also negative for *E. coli*.

2) Colilert-18—If the sample has a bluish fluorescence equal to or greater than that of a total-coliform-positive comparator, then it is positive for *E. coli*. If the fluorescence is ambiguous (cannot be discerned), the sample may be incubated for up to 4 h longer to allow the fluorescence to intensify. If sample fluorescence does intensify to equal to or greater than that of the comparator within this period, then the sample is positive for *E. coli*.

If sample fluorescence remains less than that of the comparator after 22 h of incubation, then it is negative for *E. coli*. Samples that are negative for total coliform bacteria are also negative for *E. coli*.

3) Colisure—If a total-coliform-positive sample fluoresces, then it is positive for *E. coli*. If the fluorescence is ambiguous (cannot be discerned), the sample should be incubated for up to 24 h longer to allow the fluorescence to intensify. If the sample clearly fluoresces within this period, then it is positive for *E. coli*.

If sample does not fluoresce after 48 h of incubation, then it is negative for *E. coli*. Samples that are negative for total coliform bacteria are also negative for *E. coli*.

6. Reporting

For the presence-absence procedure, report results as total coliforms and *E. coli* present or absent in a 100-mL sample.

For the multiple-tube procedure, calculate the MPN value for total coliforms and *E. coli* from the number of positive tubes, as described in Section 9221C.

For the multi-well procedure, determine the MPN from the appropriate MPN tables obtained from the tray manufacturer.

7. Bibliography

- EDBERG, S.C., M.J. ALLEN, D.B. SMITH & THE NATIONAL COLLABORATIVE STUDY. 1988. National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from drinking water: Comparison with the standard multiple tube fermentation method. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1595.
- EDBERG, S.C. & M.M. EDBERG. 1988. A defined substrate technology for the enumeration of microbial indicators of environmental pollution. *Yale J. Biol. Med.* 61:389.
- COVERT, T.C., L.C. SHADIX, E.W. RICE, J.R. HAINES & R.W. FREYBERG. 1989. Evaluation of the Autoanalysis Colilert test for detection and enumeration of total coliforms. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2443.
- EDBERG, S.C., M.J. ALLEN, D.B. SMITH & THE NATIONAL COLLABORATIVE STUDY. 1989. National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous detection of total coliforms and *Escherichia coli* from drinking water: Comparison with presence-absence techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1003.
- EDBERG, S.C. & D.B. SMITH. 1989. Absence of association between total heterotrophic and total coliform bacteria from a public water supply. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:380.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 1989. National Primary Drinking Water Regulations: Analytical techniques; Coliform Bacteria; Final Rule. 40 CFR Part 141; *Fed. Reg.* 54:29998.
- EDBERG, S.C., M.J. ALLEN, D.B. SMITH & N.J. KRIZ. 1990. Enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from source water by the defined substrate technology. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:366.
- RICE, E.W., M.J. ALLEN & S.C. EDBERG. 1990. Efficacy of β -glucuronidase assay for identification of *Escherichia coli* by the defined-substrate technology. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1203.
- EDBERG, S.C., M.J. ALLEN & D.B. SMITH. 1991. Defined substrate technology method for rapid and simultaneous enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from water: Collaborative study. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 74:526.
- EDBERG, S.C., F. LUDWIG & D.B. SMITH. 1991. The Colilert® System for Total Coliforms and *Escherichia coli*. Amer. Water Works Assoc. Res. Found., Denver, Colo.
- RICE, E.W., M.J. ALLEN, D.J. BRENNER & S.C. EDBERG. 1991. Assay for β -glucuronidase in species of the genus *Escherichia* and its application for drinking water analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:592.
- SHADIX, L.C. & E.W. RICE. 1991. Evaluation of β -glucuronidase assay for the detection of *Escherichia coli* from environmental waters. *Can. J. Microbiol.* 37:908.



- COVERT, T.C., E.W. RICE, S.A. JOHNSON, D. BERMAN, C.H. JOHNSON & P.M. MASON. 1992. Comparing defined-substrate coliform tests for the detection of *Escherichia coli* in water. *J. Amer. Water Works Assoc.* 84(5):98.
- MCCARTY, S.C., J.H. STANDRIDGE & M.C. STASIAK. 1992. Evaluating a commercially available defined-substrate test for recovery of chlorine-treated *Escherichia coli*. *J. Amer. Water Works Assoc.* 84(5):91.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 1992. National Primary Drinking Water Regulations: Analytical techniques; Coliform Bacteria; Final Rule. 40 CFR Part 141; *Fed. Reg.* 57:24744.
- CLARK, J.A. & A.H. SHAARAWI. 1993. Evaluation of commercial presence-absence test kits for detection of total coliforms, *Escherichia coli*, and other indicator bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:380.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 1994. National Primary and Secondary Drinking Water Regulation: Analytical methods for regulated drinking water contaminants; Final Rule. 40 CFR Parts 141 & 143; *Fed. Reg.* 59:62456.
- McFETERS, G.A., S.C. BROADWAY, B.H. PYLE, M. PICKETT & Y. EGOZY. 1995. Comparative performance of Colisure™ and accepted methods in the detection of chlorine-injured total coliforms and *E. coli*. *Water Sci. Technol.* 31:259.

9224 DETECTION OF COLIPHAGES*

9224 A. Introduction

1. General Discussion

Coliphages are bacterial viruses that infect and replicate in *Escherichia coli*. They are shed in human and animal feces. Although coliphages are not known to be hazardous to human beings, they are potentially important microorganisms for monitoring the microbial quality of water and wastewaters.¹

The detection of coliphages has been of increasing interest since it has become clear that bacterial monitoring of waters and wastewaters may not adequately indicate the presence of viruses in those waters.² The presence of pathogenic human viruses in waters is a public health concern. Waterborne outbreaks of viral illnesses, such as gastroenteritis and hepatitis A, occur in the United States and elsewhere.^{3,4} Detection of human enteric viruses in water and wastewaters, however, is beyond the capabilities of most water laboratories. Such detection traditionally has required the use of cell culture techniques.⁵ These techniques are expensive, require skilled personnel, and have been both time- and labor-intensive. Coliphage assays, on the other hand, are relatively inexpensive, are easier to perform with trained personnel, and yield overnight results. Coliphage assays have been proposed as an alternative to human virus assays as an indicator of the viral quality of waters.^{6,7}

Recent progress has been made in the development of specific coliphage methods for evaluating waters and wastewaters. Much of this work has focused on the detection of the group of coliphages known as the male-specific RNA coliphages (also referred to as the F-specific RNA coliphages or FRNA coliphages).⁸ These coliphages are 20 to 30 nm in size, contain a single-stranded RNA genome, and have an isometric morphology. They exclusively infect bacterial cells that possess an F pilus, an appendage used for bacterial conjugation. Their

significance lies in the fact that these coliphages are structurally similar to many human RNA viruses found in fecally contaminated waters. In particular, they resemble viruses of the picornavirus and calicivirus families, which include poliovirus; coxsackievirus; Norwalk and other noroviruses; hepatitis A virus; and hepatitis E virus. The human viruses cannot replicate in the environment. Similarly, the male-specific RNA coliphages have only limited replication in the environment at temperatures below 30°C.⁹ Male-specific RNA coliphages also resemble many human enteric viruses in being relatively resistant to disinfection treatment practices. Because of these characteristics, male-specific RNA coliphages are promising candidate indicators of human viruses in environmental waters.

In the procedures presented here, methods have been included for the detection of the male-specific RNA coliphages using host *E. coli* Famp and for the detection of somatic coliphages using *E. coli* C.¹⁰ Somatic coliphages, unlike the male-specific coliphages, are coliphages that do not require the presence of an F pilus to infect host cells. They represent a broad assortment of coliphage types and have often been included in environmental studies. Also presented here is a procedure that uses an alternate host bacterium, *Salmonella typhimurium* WG49. That host has been used by many laboratories to detect male-specific RNA coliphages and it previously has been used in one standard method protocol.¹¹ Although a double-agar-layer plaque assay has been specified in these procedures, a single-agar-layer method also is presented and can be used as an alternate plaque assay. Such a single-agar-layer assay has been incorporated into a method developed for the examination of ground waters.¹² One additional procedure, a membrane filter method for assaying 100-mL (and larger) sample volumes, is also presented here. Other methods are available elsewhere. One, an enrichment method, has particular usefulness as a presence-absence assay.¹³ Unless otherwise indicated in the procedures described here, refer to Sections 9060A and B for guidance about sample collection, preservation, and storage.

* Approved by Standard Methods Committee 2004.

Joint Task Group: 22nd Edition—Fred P. Williams, Jr. and Ronald E. Stetler (co-chairs), Samuel R. Farrah, Pierre Payment, Mark D. Sobsey, William A. Yanko.



**REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
ESTADO DA PARAÍBA
CARTÓRIO AZEVEDO BASTOS
FUNDADO EM 1888
PRIMEIRO REGISTRO CIVIL DE NASCIMENTO E ÓBITOS E PRIVATIVO DE CASAMENTOS, INTERDIÇÕES E TUTELAS DA COMARCA DE JOÃO
PESSOA**

Av. Epitácio Pessoa, 1145 Bairro dos Estados 58030-00, João Pessoa PB
Tel.: (83) 3244-5404 / Fax: (83) 3244-5484
<http://www.azevedobastos.not.br>
E-mail: cartorio@azevedobastos.not.br



DECLARAÇÃO DE SERVIÇO DE AUTENTICAÇÃO DIGITAL

O Bel. Válber Azevêdo de Miranda Cavalcanti, Oficial do Primeiro Registro Civil de Nascimentos e Óbitos e Privativo de Casamentos, Interdições e Tutelas com atribuição de autenticar e reconhecer firmas da Comarca de João Pessoa Capital do Estado da Paraíba, em virtude de Lei, etc...

DECLARO ainda que, para garantir transparência e segurança jurídica de todos os atos oriundos da atividade Notarial e Registral no Estado da Paraíba, foi instituído pela Lei Nº 10.132, de 06 de novembro de 2013, a aplicação obrigatória de um Selo Digital de Fiscalização Extrajudicial em todos os atos de notas e registro, composto de um código único (por exemplo: Selo Digital: ABC12345-X1X2) e dessa forma, cada autenticação processada pela nossa Serventia pode ser verificada e confirmada tantas vezes quanto for necessário através do site do Tribunal de Justiça do Estado da Paraíba, endereço <https://corregedoria.tjpb.jus.br/selo-digital/>.

A autenticação digital do documento faz prova de que, na data e hora em que ela foi realizada, a empresa IDEXX BRASIL LABORATORIOS LTDA tinha posse de um documento com as mesmas características que foram reproduzidas na cópia autenticada, sendo da empresa IDEXX BRASIL LABORATORIOS LTDA a responsabilidade, única e exclusiva, pela idoneidade do documento apresentado a este Cartório.

Nesse sentido, declaro que a IDEXX BRASIL LABORATORIOS LTDA assumiu, nos termos do artigo 8º, §1º, do Decreto nº 10.278/2020, que regulamentou o artigo 3º, inciso X, da Lei Federal nº 13.874/2019 e o artigo 2º-A da Lei Federal 12.682/2012, a responsabilidade pelo processo de digitalização dos documentos físicos, garantindo perante este Cartório e terceiros, a sua autoria e integridade.

De acordo com o disposto no artigo 2º-A, §7º, da Lei Federal nº 12.682/2012, o documento em anexo, identificado individualmente em cada Código de Autenticação Digital¹ ou na referida sequência, poderá ser reproduzido em papel ou em qualquer outro meio físico.

Esta DECLARAÇÃO foi emitida em **29/01/2021 15:31:53 (hora local)** através do sistema de autenticação digital do Cartório Azevêdo Bastos, de acordo com o Art. 1º, 10º e seus §§ 1º e 2º da MP 2200/2001, como também, o documento eletrônico autenticado contendo o Certificado Digital do titular do Cartório Azevêdo Bastos, poderá ser solicitado diretamente a empresa IDEXX BRASIL LABORATORIOS LTDA ou ao Cartório pelo endereço de e-mail autentica@azevedobastos.not.br Para informações mais detalhadas deste ato, acesse o site <https://autdigital.azevedobastos.not.br> e informe o Código de Autenticação Digital

Esta Declaração é válida por **tempo indeterminado** e está disponível para consulta em nosso site.

¹Código de Autenticação Digital: 69832901216084259336-1 a 69832901216084259336-23

²Legislações Vigentes: Lei Federal nº 8.935/94, Lei Federal nº 10.406/2002, Medida Provisória nº 2200/2001, Lei Federal nº 13.105/2015, Lei Estadual nº 8.721/2008, Lei Estadual nº 10.132/2013, Provimento CGJ N° 003/2014 e Provimento CNJ N° 100/2020.

O referido é verdade, dou fé.

CHAVE DIGITAL

00005b1d734fd94f057f2d69fe6bc05bb52014610a2f3400ab4f86c1e09af7282ca6a98da3de9d1faecc5dfebefbdf2abe95356bc20879c3745d7789aa8d02a0c29c7dca6742f69e0e4ff304365d655



Presidência da República
Casa Civil
Medida Provisória Nº 2.200-2,
de 24 de agosto de 2001.

