



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

RAFAEL MARTIN MOREIRA MARQUES

**Descrição da rotina de atividades do laboratório de Microbiologia Médica
de Medicina Veterinária da FAV-UnB.**

Relatório de estágio apresentado para a conclusão do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

Brasília / DF

2014



RAFAEL MARTIN MOREIRA MARQUES

**Descrição da rotina de atividades do laboratório de Microbiologia Médica
de Medicina Veterinária da FAV-UnB.**

Relatório de estágio apresentado para a conclusão
do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de
Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade
de Brasília.

**Brasília / DF
2014**

FICHA CATALOGRÁFICA

MARQUES, M.M. Rafael

Descrição da rotina das atividades do laboratório de Microbiologia Médica de Medicina Veterinária da FAV/UnB /Rafael Martin Moreira Marques; orientação de Simone Perecmanis – Brasília, 2014. 30 p.: il.

Monografia – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2014.

Cessão de Direitos

Nome do Autor: Rafael Martin Moreira Marques

Título da Monografia de Conclusão de Curso: Descrição da rotina das atividades do laboratório de Microbiologia Médica de Medicina Veterinária da FAV/UnB.

Ano: 2014

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

(Assinatura)

CPF: 037.008.821-22

Endereço: SQSW 306 BL A APT 106

CEP: 70673-431

Telefone: 3361-1842

E-mail: rafaelmarquesvet@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: Rafael Martin Moreira Marques

Título: Descrição da rotina das atividades do laboratório de Microbiologia Médica de Medicina Veterinária da FAV/UnB.

Monografia de conclusão do Curso de Medicina Veterinária apresentada à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.^a Dr.^a Simone Perecmanis

Instituição: UnB

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Mv. Marcus Portugal

Instituição: UnB

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Mv. Diego Maués Costa Ribeiro

Instituição: UnB

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Brasília

Dezembro 2014

DEDICATÓRIA

*À todas as pessoas que
sempre estiveram ao meu
lado e me apoiaram.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à toda a minha família que sempre apoiou minhas decisões e sempre me deu base para seguir em minhas escolhas.

Aos amigos que fiz durante o curso, os melhores amigos por sinal.

À professora Simone pela oportunidade e orientação que me deu.

Aos residentes, técnicos e estagiários, que me suportaram e me ajudaram muito durante esse período.

Aos professores, que muito me ensinaram durante minha graduação.

E principalmente pelas experiências que vivi durante o curso, que de fato, mudaram minha vida, minhas atitudes e minha forma de ver o mundo, para melhor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estufa, reservatório de água destilada e reagentes do setor de preparo de meios.....	13
Figura 2 – Forno de micro-ondas, balança de precisão e banho-maria do setor de preparo de meios.....	13
Figura 3 – Armário para armazenar meios de cultura desidratados.....	13
Figura 4 – Autoclave para esterilização de meios de cultura e vidrarias.....	14
Figura 5 – Pia para lavagem de vidrarias.....	14
Figura 6 – Estufa para cultivo de microrganismos.....	15
Figura 7 – Capela de fluxo laminar.....	15
Figura 8 –Geladeiras para armazenar meios de cultura, testes bioquímicos e materiais contaminados.....	15
Figura 9 – Placa de Ágar sangue Base® após processo de isolamento de cultura.....	16
Figura 10 - Cultura de <i>Escherichia coli</i> em Ágar MacConkey®.....	17
Figura 11 - Cultura de <i>Escherichia coli</i> em Ágar EMB®.....	18
Figura 12 - Cultura de pelos em Ágar Micobiótico®.....	19
Figura 13 - Cultura de <i>Proteus</i> em Ágar CLED®.....	20
Figura 14 - Placa de Ágar Cetrimidas®.....	21
Figura 15 - Placa de Ágar Sabouraud®.....	21

Figura 16 - Suporte e corantes para coloração de Gram.....	25
Figura 17 - Teste de KOH positivo.....	27
Figura 18 - Teste de catalase positivo.....	28
Figura 19 - Teste de oxidase positivo à esquerda e negativo à direita.....	29
Figura 20 - OF fermentativo.....	30
Figura 21 - OF oxidativo.....	30
Figura 22 - OF não reativo.....	30
Figura 23 - Tubo de VM sem vermelho de metil à esquerda, tubo positivo com vermelho de metil à direita.....	31
Figura 24 - Resultado do antibiograma após incubação 24 horas.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	graus Celsius
ml	mililitro
KOH	hidróxido de potássio
POP	procedimento operacional padrão
VM	vermelho de metila
VP	Vogues Prokauer
TSI	tri sugar iron
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
LCR	líquido cefalorraquidiano

SUMÁRIO

1. Introdução.....	12
2. Estrutura do Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da UnB.....	13
2.1 Setor de preparo de meios e soluções.....	13
2.2 Setor de lavagem e esterilização.....	14
2.3 Setor de exames bacteriológicos, fúngicos e citológicos.....	14
3. Rotina de atividades.....	15
3.1 Meios de cultura.....	15
3.1.1 Ágar sangue Base®.....	16
3.1.2 Ágar MacConkey®.....	17
3.1.3 Ágar Müller Hinton® e Müller Hinton® sangue.....	17
3.1.4 Ágar EMB®, Eosina Azul de Metileno.....	18
3.1.5 Ágar Micobiótico®.....	18
3.1.6 Ágar CLED®.....	19
3.1.7 Ágar Cetrimidas®.....	20
3.1.8 Ágar Sabouraud®.....	21
3.1.9 Caldo Tioglicolato®.....	22
3.2 Recebimento de amostras.....	22
3.3 Cultura de amostras	22
3.4 Isolamento.....	23
3.5 Repique.....	24
3.6 Coloração de Gram.....	24
3.7 Testes bioquímicos.....	26
3.7.1 Teste do hidróxido de potássio (KOH).....	26
3.7.2 Teste da catalase.....	27
3.7.3 Teste da oxidase.....	28
3.7.4 Teste da oxidação/fermentação da glicose.....	29
3.7.5 Teste do indol.....	30

3.7.6 Teste de vermelho de metila (VM).....	30
3.7.7 Teste de Vogues Prokauer (VP).....	31
3.7.8 Teste de citrato.....	31
3.7.9 Teste TSI.....	32
3.7.10 Teste da gelatina.....	32
3.7.11 Teste da motilidade.....	32
3.8 Antibiograma.....	33
3.9 Cultura fúngica.....	34
3.9.1 Cultura de fungos dermatófitos.....	33
3.10 Exame citológico.....	35
3.10.1 Citologia de amostras de ouvido.....	35
3.10.2 Exame de campo escuro para verificação de <i>Leptospira</i> spp.....	35
4. Considerações finais.....	37
5.Referências bibliográficas.....	38

1. Introdução

Este relatório teve como objetivo descrever os procedimentos e atividades realizadas no Laboratório de Microbiologia Médica Médica FAV - UnB no período de 11 de outubro até 9 de dezembro, para atender o estágio supervisionado curricular do curso de Medicina Veterinária.

Dentre as principais funções do laboratório de Microbiologia Médica que foram acompanhadas encontram-se as ações de examinar e cultivar amostras para detecção de microrganismos, identificar as espécies envolvidas em isolamentos importantes e realizar as provas de suscetibilidade a antibióticos, quando indicadas. Estas tarefas auxiliarão os médicos veterinários no diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas. Os dados microbiológicos organizados são também importantes ferramentas para avaliar a antibioticoterapia e proporcionar informação epidemiológica para definir fontes comuns de infecção.

As amostras analisadas no período do estágio foram encaminhadas ao laboratório de microbiologia, após serem obtidas de animais vivos antes da administração de antibioticoterapia. Amostras de animais mortos deverão ser colhidas o quanto antes, se possível, sem alterações autolíticas ou putrefativas. Quando houverem locais onde provavelmente haja contaminação por mais de um patógeno, os espécimes devem ser colhidos mediante procedimentos que minimizem a contaminação, se fazendo necessário a refrigeração (QUINN et al., 2005).

2. Estrutura do Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da UnB

O laboratório é constituído de 3 setores distintos, setor de preparo de meios de cultura e soluções, setor de lavagem e esterilização de materiais e setor de exames bacteriológicos, fúngicos e citológicos.

2.1. Setor de preparo de meios de cultura e soluções:

Setor onde são armazenados e preparados os meios de cultura, soluções e demais instrumentos e materiais necessário para o preparo dos mesmos.

Este setor é composto pelos seguintes equipamentos: materiais para o preparo de meios e soluções (béqueres, erlenmeyers, pipetas, provetas, bastões de vidros, entre outros), balança de precisão, pHmetro, forno de micro-ondas, estufa para secagem de materiais plásticos, estufa para secagem de vidraria, banho-maria, pia e reservatório para água destilada.

As figuras 1, 2 e 3 mostram alguns dos equipamentos que compõe o setor de preparo de meios.



Figura 1- Estufa, reservatório de água destilada e reagentes.



Figura 2- Forno de micro-ondas, balança de precisão e banho-maria.



Figura 3- Armário para armazenar meios

Fonte: Arquivo Pessoal/Rafael Marques

2.2. Setor de lavagem e esterilização

Neste setor que ocorre a lavagem e esterilização, através do uso da autoclave, de todo o material que é utilizado e/ou descartado no laboratório.

Possui os seguintes equipamentos: autoclave para descarte de materiais de risco biológico, autoclave para esterilização de meios de cultura e vidraria, estufa para secagem de materiais plásticos, estufa para secagem de vidraria, pia, destilador e reservatórios de água destilada (figuras 4 e 5).



Figura 4 - Autoclave para esterilização de meios de cultura e vidrarias.



Figura 5 - Pia para lavagem de vidrarias.

Fonte: Arquivo Pessoal/Rafael Marques

2.3. Setor de exames bacteriológicos, fúngicos e citológicos

Setor onde são recebidas e armazenadas as amostras, que posteriormente serão processadas para a realização dos exames bacteriológicos, fúngicos e/ou citológicos. É neste setor que ocorre também a distribuição dos meios de cultura e a realização dos antibiogramas.

Os principais equipamentos e materiais que compõe o este setor são: duas estufas para cultivo microbiológico, duas geladeiras para armazenamento de meios de cultura e testes bioquímicos, uma geladeira para armazenamento de material contaminado, duas pias, dois bicos de Bünsen, dois microscópios ópticos, um microscópio de campo escuro, capela de fluxo laminar e insumos utilizados na rotina (álcool 70%, reagentes para coloração de gram, reagentes para os testes bioquímicos, lâminas para microscopia, placas de Petri, entre outros).

As figuras 6, 7 e 8 mostram as estufas para cultivo microbiológico, capela de fluxo laminar e geladeiras para armazenamento de meios de cultura e testes bioquímicos e material contaminado.



Figura 6 - Estufas para cultivo microbiológico.

Figura 7 - Capela de fluxo laminar.

Figura 8 - Geladeiras para armazenar meios de cultura, testes bioquímicos e material contaminado.

Fonte: Arquivo Pessoal/Rafael Marques

3. Rotina de atividades

3.1. Meios de cultura

Os meios de cultura mais utilizados na rotina do laboratório são o ágar sangue Base®, ágar MacConkey®, ágar Müller Hinton®, ágar EMB®, ágar

Micobiótico®, ágar CLED®, ágar Müller Hinton® sangue, ágar Ceftrimidas®, ágar Sabouraud® e caldo Tioglicolato®.

3.1.1. Ágar sangue Base®

É o meio de eleição primária na rotina para se realizar o isolamento na rotina, pois pelo fato de ser altamente nutritivo ele possibilita o crescimento da maioria das bactérias de interesse. Além disso, ele permite determinar a atividade hemolítica das bactérias (QUINN et al., 2005).

Após o meio ser resfriado até 45-50°C, deve-se adicionar 5% de sangue de carneiro desfibrinado estéril (BIOBRÁS), esse processo é realizado na capela de fluxo laminar.



Figura 9 - Placa de Ágar sangue Base® após processo de isolamento de cultura.

Fonte: Arquivo Pessoal/Rafael Marques

3.1.2. Ágar MacConkey®

Meio seletivo para isolar e identificar Enterobactérias. É através da mistura de sais biliares que ele consegue inibir o crescimento de organismos Gram-positivos (BIOBRÁS). Além disso, fazem parte da composição desse meio a lactose e o identificador de pH vermelho neutro, com isso os microrganismos que fermentam a lactose são corados de rosa (QUINN et al., 2005).



Figura 10 - Cultura de *Escherichia coli* em Ágar MacConkey®.

Fonte: Arquivo Pessoal/Rafael Marques

3.1.3. Ágar Müller Hinton® e Müller Hinton® sangue

É um meio rico em nutrientes, o qual é utilizado na realização de antibiograma através da técnica de difusão de discos. Para microrganismos mais fastidiosos recomenda-se preparar o meio com a adição de 5% de sangue de carneiro desfibrinado (BIOBRÁS).

3.1.4. Ágar EMB®, Eosina Azul de Metileno

Meio utilizado para isolamento de Enterobactérias, principalmente para a diferenciação de *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes*. As colônias de *Escherichia coli* mostram um brilho verde metálico, já as colônias de *Enterobacter aerogenes* não possuem esse brilho (OXOID, 2000).

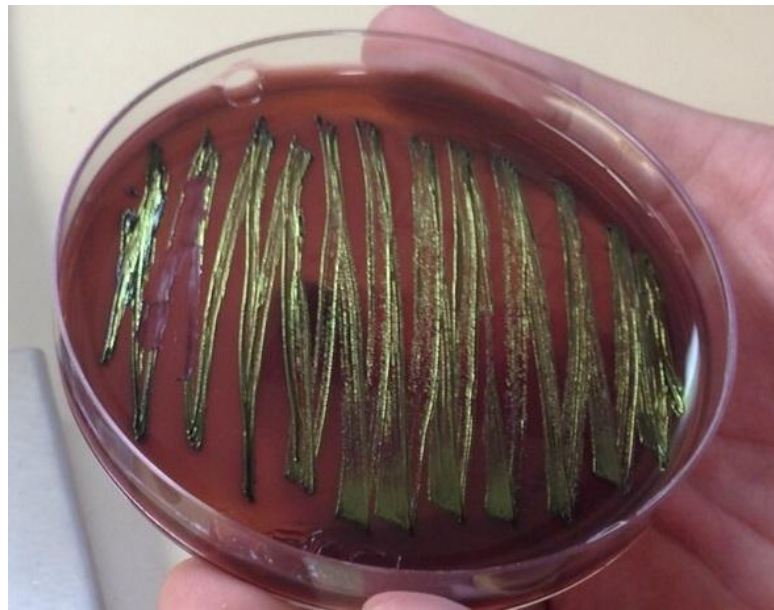


Figura 11 - Cultura de *Escherichia coli* em Ágar EMB®.

Fonte: Arquivo Pessoal/Rafael Marques

3.1.5. Ágar Micobiótico®

Meio usado para isolar, principalmente, fungos dermatófitos. Ele é composto, entre outras coisas, por Cicloheximida, que seleciona dermatófitos, e por Cloranfenicol, que inibe o crescimento de bactérias e de alguns fungos filamentosos.

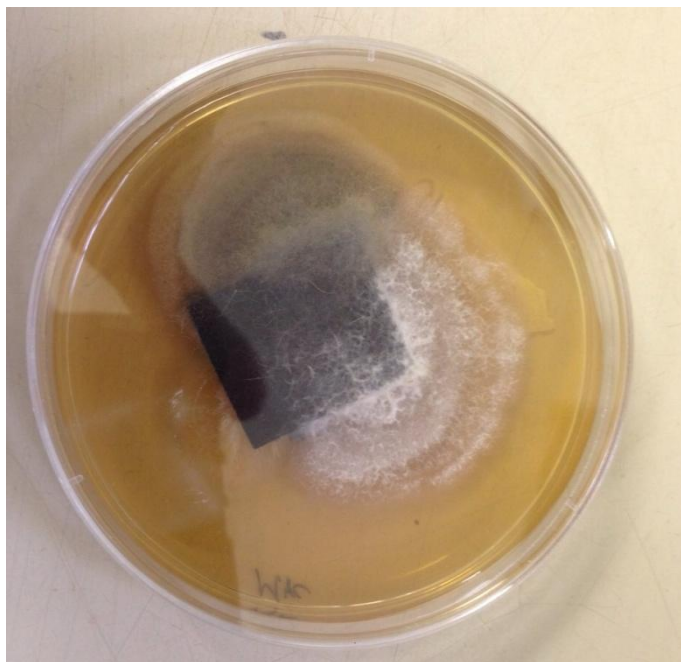


Figura 12- Cultura de pelos em Ágar Micobiótico®.

Fonte: Arquivo Pessoal/Rafael Marques

3.1.6. Ágar CLED®

Meio utilizado para a cultura de bactérias presentes em amostras de urina (BIOBRÁS). E inibe a formação do véu de cepas de *Proteus* devido a deficiência de eletrólitos (ANVISA, 2004).

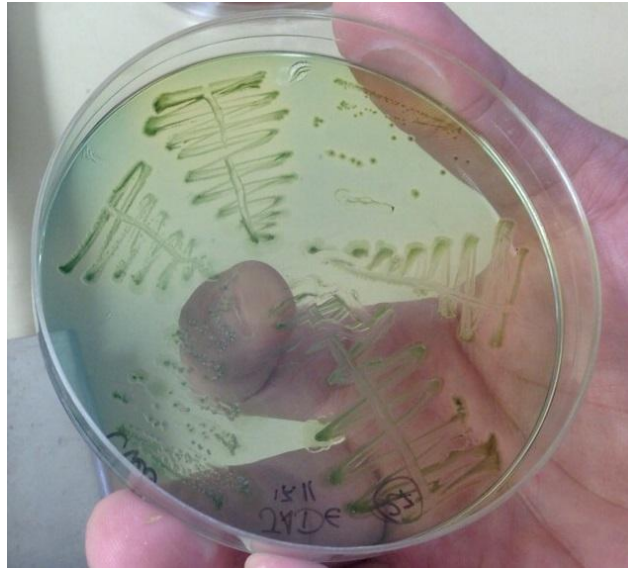


Figura 13 - Cultura de *Proteus* em Ágar CLED®.

Fonte: Arquivo Pessoal/Rafael Marques

3.1.7. Ágar Cetrímidas®

Meio específico utilizado para isolar e identificar colônias de *Pseudomonas aeruginosa*. Esse meio favorece a produção de piocianina e fluoresceína sob luz ultravioleta, o que dão colorações específicas as colônias (BIOBRÁS).

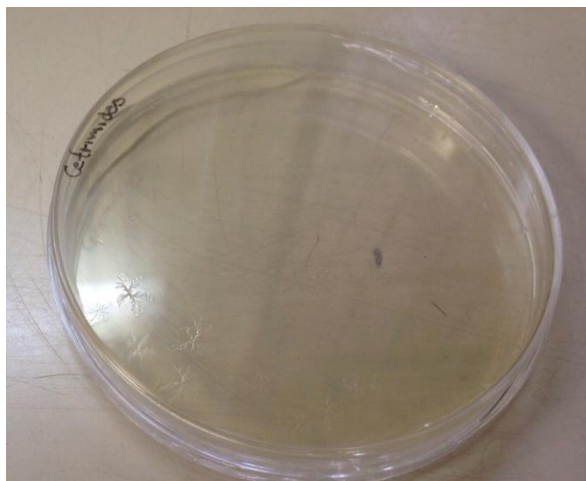


Figura 14 - Placa de Ágar Cetrimidas®.

Fonte: Arquivo Pessoal/Rafael Marques

3.1.8. Ágar Sabouraud®

É um meio utilizado para cultivo e crescimento de fungos que estão associados a infecções superficiais, nos casos de algumas espécies de *Candida* e fungos filamentosos (ANVISA, 2004).

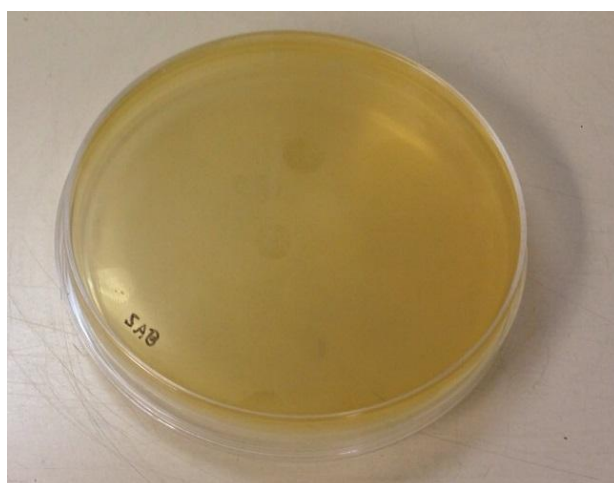


Figura 15 - Placa de Ágar Sabouraud®.

Fonte: Arquivo Pessoal/Rafael Marques

3.1.9. Caldo Tioglicolato®

É um meio que favorece o crescimento de microrganismos anaeróbios e microaerófilos, pois o tioglicolato de sódio presente no meio neutraliza o efeito bacteriostático dos componentes mercúrio usados como preservativos e ainda é um agente redutor e estabelece um baixo nível de tensão de oxigênio (BIOBRÁS).

3.2. Recebimento de amostras

Na rotina do laboratório as amostras recebidas serão destinadas a exames bacteriológicos, fúngicos e/ou citológicos. Esses materiais devem vir identificadas e acompanhadas da ficha do animal, a qual deve conter todas as informações do mesmo e sempre que possível, a suspeita clínica que pode direcionar a execução dos testes que serão realizados. Após o recebimento da amostra, a ficha do animal será anexada na ata correspondente ao tipo de exame que será realizado e todos os procedimentos que forem realizados com esta amostra serão devidamente anotados na ata. Após a conclusão dos exames, com a identificação ou a ausência do microrganismo, um laudo é emitido e fica armazenado no computador do laboratório.

3.3. Cultura da amostra

Para a inoculação em meios de cultura sólidos são utilizados alças ou ainda agulhas, feitas de níquel-cromo ou platina. Os meios de cultura sólidos distribuídos em placas de Petri, são inoculados preferencialmente com alças, procurando-se obter colônias isoladas através da semeadura por esgotamento, tendo-se o cuidado de flambar a alça a cada movimento na placa (OLIVEIRA, 1994).

Como as amostras mais comuns na rotina do laboratório são swabs de secreções e urina, as inoculações são realizadas em ágar sangue base®, para ambos os casos, e em caldo tioglicolato®, nos casos de amostras de urina.

No caso das amostras de swab, utiliza-se o próprio para estriar a placa de ágar sangue base®. Já nas amostras de urina, utiliza-se uma gota para se realizar a

estriação na placa de ágar sangue base®, com auxílio de uma alça bacteriológica flambada para estriar a placa. Depois é adicionado duas gotas de urina ao caldo tioglicolato®. As placas de ágar sangue base® e os tubos de caldo tioglicolato® devem ser sempre identificados com o nome do animal, a data do procedimento e o número da página na qual a ficha do animal foi anexada na ata.

Após a inoculação, os meios devem permanecer em estufa à 37°C de 24 a 48 horas e então analisa-se se houve crescimento bacteriano ou não. No caso de haver crescimento bacteriano as colônias são avaliadas macroscopicamente quanto cor, forma, consistência, odor e se houve hemólise ou não. Quando se tem o crescimento de apenas um tipo de colônia, deve-se preparar a lâmina para avaliação microscópica da colônia. No caso de crescimento de mais de um tipo de colônia, deve ser realizado o isolamento destas colônias para a identificação de cada uma das bactérias que podem ser a causa da enfermidade do animal e para isso pode ser necessária a inoculação das diferentes colônias em meios específicos para aquele gênero de bactéria.

3.4. Isolamento

Para se realizar o isolamento, deve-se selecionar uma colônia com uma alça bacteriológica previamente flambada e resfriada no ágar, em uma região não inoculado, e então segue-se com a semeadura da colônia em uma nova placa. Após realizar a primeira estriação a alça deve ser flambada e resfriada novamente e então coleta-se material da primeira estriação e se efetua uma nova estriação na placa, esse procedimento deve ser repetido de três a quatro vezes.

Quando se tem o crescimento de mais de um tipo de colônia em uma amostra, essas diferentes colônias devem ser isoladas umas das outras. As colônias são semeadas em uma nova placa até o esgotamento do inóculo, ou seja, ele é progressivamente diluído de modo a obter-se células isoladas que originarão colônias puras (SILVA; OLIVEIRA, 2007).

3.5. Repique

O repique é realizado quando se tem colônias insuficientes para a realização de todos os testes necessários para a identificação da bactéria. Consiste em pegar uma única colônia e estria-la e uma nova placa contendo ágar sangue base® ou algum outro meio específico para o crescimento de determinado gênero da bactéria envolvida. Ou seja, é uma técnica de multiplicação das colônias bacterianas.

A transferência é feita coletando uma alçada da cultura pura, com a alça previamente flambada, e inoculando-a no meio de cultura desejado (SILVA; OLIVEIRA, 2007).

3.6. Coloração de Gram

A coloração de Gram é a mais usada na bacteriologia e permite dividir as bactérias em Gram-positivas e Gram-negativas, que adquirem, respectivamente, coloração azul e rosa (SILVA; OLIVEIRA, 2007).

Após o isolamento da colônia bacteriana deve-se realizar a coloração de Gram, que consta primeiramente em identificar a lâmina com grafite na superfície áspera, em seguida, utilizando uma alça de níquel-cromo estéril, coloca-se na superfície da lâmina de vidro, uma gota de solução salina 0,9%. Depois disso deve-se colher uma pequena quantidade de colônias e espalhar na gota de solução salina. Para fixar a colônia recomenda-se passar a lâmina por poucos segundos na chama do bico de Bunsen. Então a lâmina é posta no suporte e coberta com cristal violeta por 1 minuto, o cristal violeta irá corar de azul-escuro as bactérias Gram-positivas mesmo após a utilização do etanol. Em seguida o excesso é retirado e agora tem sua superfície coberta por lugol por 1 minuto também, para que ocorra a fixação do corante nas bactérias Gram-positivas. O próximo passo é lavar a lâmina com etanol 100% por 10 segundos, que irá descorar as bactérias Gram-negativas, que não são intensamente coradas por cristal violeta, em seguida com água corrente. Depois utiliza-se a safranina por 15 segundos sobre a lâmina, que irá corar

de vermelho as bactérias Gram-negativas, então a lâmina será lavada com água corrente mais uma vez. Por último a lâmina deve ser deixada inclinada para que possa secar.

Depois de todos esses passos a lâmina está pronta para ser visualizada no microscópio no aumento de 1000 vezes mas para isso uma gota de óleo de imersão deve ser aplicada sobre a lâmina. Após a visualização da mesma deve ser anotado em ata a morfologia(cocos, bastonetes, vibriões ou espirilos) e a classificação em Gram-positiva(as coradas com aspecto roxo) ou Gram-negativas(as coradas com aspecto avermelhado ou rosa). E depois de feito tudo isso a lâmina deve ser descartada no recipiente adequado e a lente do microscópio deve ser limpa com algodão macio embebido em etanol 100% (POP 53_00).



Figura 16 - Suporte e corantes para coloração de Gram.

Fonte: Gentilmente cedida por Luis Carlos Pires Rayol Filho

3.7. Testes bioquímicos

Testes bioquímicos relacionados à atividade catabólica da bactéria e um sistema indicador são geralmente empregados para demonstrar a utilização de um substrato específico. Devido ao fato de a variedade de açúcares utilizados por espécies bacterianas individuais ser geralmente limitada, o catabolismo de diferentes açúcares é, com frequência, usado para identificação (QUINN, 2005).

Após a classificação das bactérias quanto a sua morfologia e a coloração de Gram, elas passam por uma série de testes bioquímicos para que assim possa fechar a identificação dessas bactérias. Entre os testes mais utilizados na rotina do laboratório estão, o teste do hidróxido de potássio (KOH), da catalase, da oxidase, da oxidação/fermentação da glicose, de indol, de vermelho de metila (VM), de Vogues Prokauer (VP), de citrato, de TSI, gelatina e motilidade.

3.7.1. Teste do hidróxido de potássio (KOH)

O teste serve para confirmar se a bactéria é Gram-positiva ou Gram-negativa. Ele é realizado depositando-se uma gota da solução de KOH 3% na superfície de uma lâmina de vidro, em seguida com uma alça bacteriológica previamente flambada e resfriada, coleta-se uma colônia e realiza o esfregaço da mesma na solução de KOH 3%. Por até 60 segundos deve-se realizar repetidamente a elevação da alça para analisar a formação de um fio viscoso. Se houver a formação desse fio o teste é positivo e a bactéria é Gram-negativa (QUINN, 1994).

A formação do fio viscoso ocorre devido à parede das bactérias Gram-negativas possuir pequena quantidade de peptidoglicana, que em contato com o KOH 3%, libera o material genético e este, em contato com o KOH 3%, forma o fio viscoso (QUINN, et al, 2005).

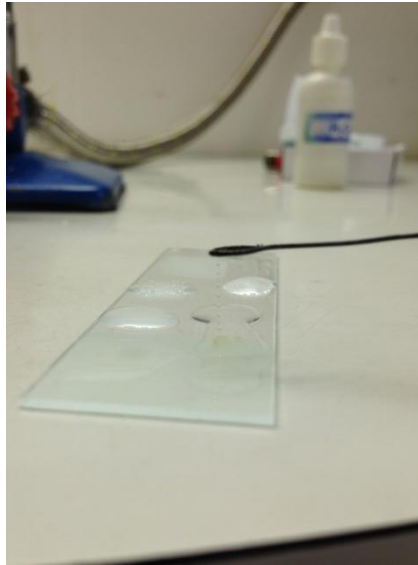


Figura 17 - Teste de KOH positivo.

Fonte: Gentilmente cedido por Luis Carlos Pires Rayol Filho

3.7.2. Teste da catalase

Serve para indicar se há ou não a presença da enzima catalase nas células bacterianas. E este teste é realizado colocando-se uma gota de água oxigenada 10 volumes em uma lâmina de vidro; em seguida uma colônia bacteriana é inoculada na gota de água oxigenada, com auxílio de uma alça bacteriana previamente flambada e resfriada. Durante 30 segundos, deve-se observar se ocorre ou não a formação de bolhas. Se houver o teste é positivo, se não, o teste é negativo. A formação de bolhas acontece pois a catalase é uma enzima que decompõe a água oxigenada, liberando assim oxigênio (OLIVEIRA, 2000).

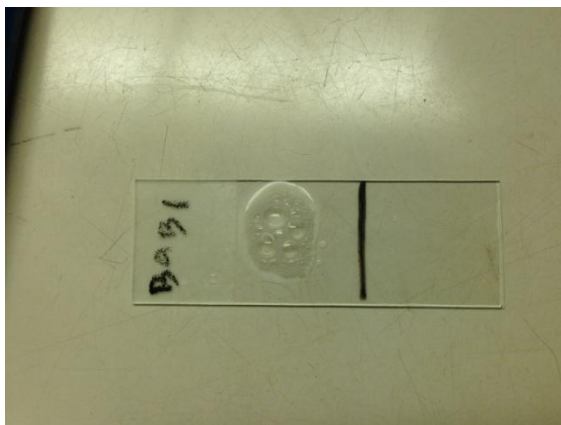


Figura 18 - Teste de catalase positivo.

Fonte: Gentilmente cedido por Luis Carlos Pires Rayol Filho

3.7.3. Teste da oxidase

Serve pra indicar se há a presença, ou não, de citocromo oxidase C nas células bacterianas. Este teste é realizado com o auxílio de uma alça bacteriológica de platina, que deve ser previamente flambada e resfriada. Com a alça bacteriológica deve-se colher uma colônia e esfregar a mesma em uma fita de oxidase. Se o local onde houve o contato da colônia com a fita ficar roxo o teste é positivo. O sistema de citocromo oxidase está presente somente em microrganismo aeróbios e a maioria das bactérias Gram-positivas são oxidase negativas (OLIVEIRA, 2000).



Figura 19 - Teste de oxidase positivo à esquerda e negativo à direita.

Fonte: Gentilmente cedido por Luis Carlos Pires Rayol Filho

3.7.4. Teste da oxidação/fermentação da glicose

Indica se as bactérias utilizam a glicose através da oxidação ou da fermentação. Para a realização desse teste são necessários dois tubos contendo meio de Hugh e Leifson e glicose, e em um desses tubos contém um ml de óleo mineral estéril, para evitar que a bactéria tenha contato com o oxigênio. Então deve ser inoculado a bactéria nos dois tubos. Depois disso os tubos devem ser incubados em estufa à 37°C por até 14 dias. No caso da bactéria ser oxidativa, o tubo que não contém óleo vai adquirir uma coloração amarela, pois existe o contato com o oxigênio e com isso há a produção de ácido devido ao metabolismo da glicose através da oxidação. Já o tubo com óleo, o qual a bactéria não tem contato com o oxigênio, o meio continuará verde por não ter havido a metabolização da glicose, e consequente produção de ácido. No caso da bactéria ser fermentativa, devido ao fato de elas serem anaeróbias facultativas, ambos os tubos vão ficar com uma coloração amarela, já que irá ocorrer a produção de ácidos nos dois tubos, visto que ocorrerá a metabolização da glicose por meio da oxidação e por meio da fermentação. E quando nenhum dos tubos tem sua coloração alterada o teste é considerado não reativo (OLIVEIRA, 2000).

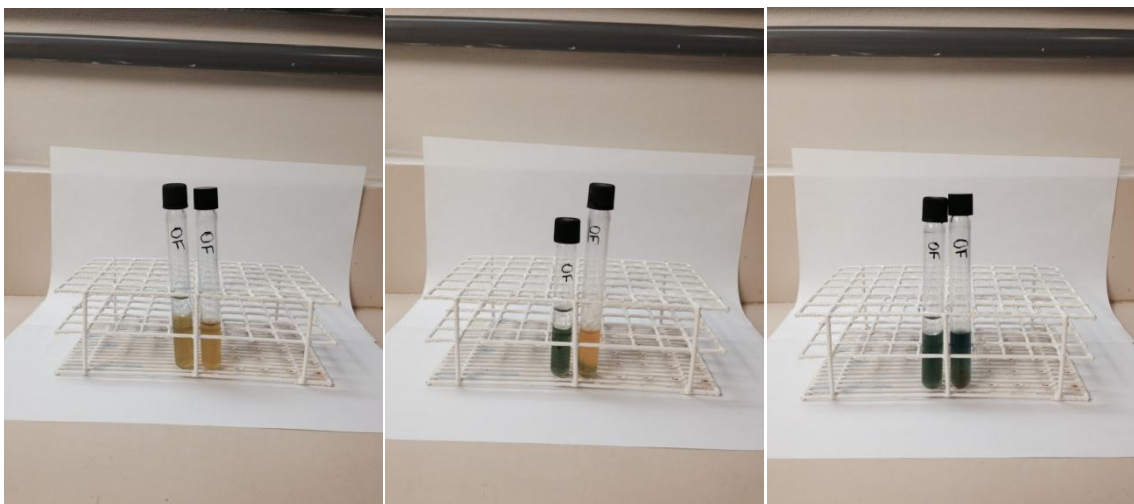


Figura 20 - OF fermentativo.

Figura 21 - OF oxidativo.

Figura 22 - OF não reativo.

Fonte: Gentilmente cedido por Luis Carlos Pires Rayol Filho

3.7.5. Teste de Indol

Indica se ocorre a degradação do triptofano, através da ação da enzima triptofanase, produzindo indol. A realização desse teste se dá através da inoculação da bactéria em um caldo que contém 1% de triptofano, sendo incubado por 48 horas. Após a incubação adicionar ao caldo 1 ml de éter ou xilol. Logo em seguida adicionar 0,5 ml de reativo de Erlich pelas paredes do tubo. Havendo a formação de um anel vermelho abaixo da camada de éter o teste é positivo (OLIVEIRA, 2000).

3.7.6. Teste de vermelho de metila (VM)

O teste serve para indicar o pH a partir da fermentação da glicose por parte da bactéria. Para a realização desse teste inocula-se a bactéria no meio VM/VP, levar a estufa 37°C por 24 a 48 horas. Após esse período adiciona-se 5 gotas de vermelho de metila no meio. Se o meio adquirir a coloração avermelhada o teste é positivo (OLIVEIRA, 2000). Isso ocorre porque o pH de 4,4 é o ponto ácido limite do

indicador vermelho de metila, com isso quando o meio adquirir um pH menor do que 4,4 ele torna-se avermelhado (KONEMAN et al., 2001).

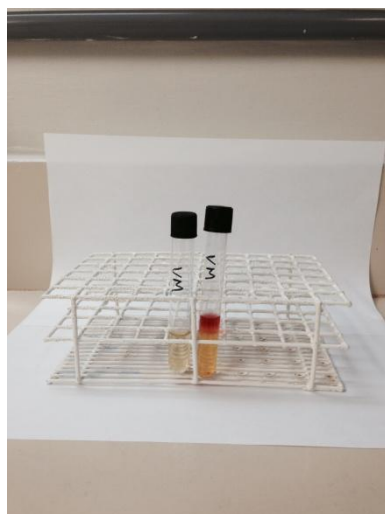


Figura 23 - Tubo de VM sem vermelho de metila à esquerda, tubo positivo com vermelho de metil à direita.

Fonte: Gentilmente cedido por Luis Carlos Pires Rayol Filho

3.7.7. Teste de Vogues Prokauer (VP)

Indica a produção de acetilmetilcarbinol pela fermentação da glicose. É feito no mesmo tubo em que foi realizado do teste de VM, e consiste em adicionar 0,2 ml de solução de VP e 0,6 ml de α -naftol, ao meio que contém a bactéria, em seguida deve-se misturar e inclinar o tubo, para que aumente a superfície de contato com o ar, por 30 minutos. Se a solução adquirir uma coloração vermelha intensa o teste é positivo (OLIVEIRA, 2000).

3.7.8. Teste de citrato

O teste serve para indicar se a bactéria é capaz de utilizar o citrato como única fonte de obtenção de carbono, na ausência da fermentação ou de produção de ácido láctico. Para a realização deste teste deve-se estriar a colônia na superfície do

meio, com auxílio de uma alça bacteriológica. Se o meio passar da cor verde para a cor azul o resultado é positivo (OLIVEIRA, 2000).

3.7.9. Teste TSI

Comprova se a bactéria é capaz de fermentar somente glicose, se é capaz de fermentar glicose, sacarose e lactose, se produz H₂S além de indicar se há a produção de gás. Para realizar esse teste inocula-se a bactéria, em um tubo contendo o meio TSI ágar, que contém lactose, sacarose, glicose e sulfato de ferro, profundamente com agulha e em seguida estriando a superfície. Então o tubo deve ser incubado por 7 dias e verificado diariamente.

Se a lactose ou a sacarose forem fermentadas, uma grande quantidade de ácido é produzida, com isso o indicador vermelho de fenol se torna amarelo, tanto no fundo do tubo quanto na superfície. Já no caso da glicose ser fermentada e a lactose não, o fundo do tubo, que é pobre em oxigênio, ficará amarelo, mas na superfície ficará vermelho, pois ocorre a oxidação do ácido em CO₂ e H₂O neutralizando o meio. Já se não houver a fermentação da glicose nem da lactose o tubo inteiro ficará vermelho. Havendo a produção de H₂S, a cor preta do sulfato de ferro será observada (LEVINSON, 1998).

3.7.10. Teste da gelatina

Indica a capacidade da bactéria em produzir a enzima gelatinase. Para se realizar o teste deve-se inocular profundamente a bactéria, com auxílio de um agulha, em um tubo de gelatina nutriente. Em seguida o tubo deve ser incubado em estufa à 37°C. Devem ser feitas leituras diárias, colocando os tubos inoculados uma ou duas horas na geladeira, para ver se há liquefação da gelatina (OLIVEIRA, 2000).

3.7.11. Teste da motilidade

Comprova a motilidade das bactérias em questão. Para se realizar o teste inocula-se profundamente no meio, 4 a 5 cm, a bactéria. Em seguida será incubado

a 37°C. As bactérias móveis irão migrar pelo meio, tornando-o turvo (OLIVEIRA,2000).

3.8. Antibiograma

Após a colônia bacteriana ser devidamente isolada e identificada, é realizado o antibiograma. Consiste em identificar a quais antibióticos a bactéria em questão é sensível ou não. Para a realização do antibiograma coleta-se poucas colônias. Com auxílio de uma alça bacteriológica previamente flambada e resfriada, e inocula-se em caldo Müller Hinton®, que será incubado por 24 horas a 37°C. Após o período de incubação a cultura deverá ser espalhada, com ajuda de um swab estéril, por toda a superfície de placas contendo ágar Müller Hinton®. Nos casos de bactérias fastidiosas, utilizar ágar Müller Hinton® sangue, quantas forem necessárias. Em seguida serão espalhados os discos de antibiótico, previamente selecionados de acordo com o sistema na qual se retirou a amostra do animal. Com auxílio de uma pinça previamente flambada os discos devem ser posicionados na superfície do ágar a uma distância comum um do outro. Normalmente são colocados de 5 a 6 discos por placa. Depois do posicionamento dos discos nas placas, as mesmas devem ser incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. Após a incubação prossegue-se com a leitura dos antibiogramas de acordo com as normas do CLSI, que serve de parâmetro para a medição do de inibição do crescimento bacteriano formado ao redor de cada um dos discos de antibiótico. Os discos são identificados por siglas, de acordo com o fabricante, e para facilitar na identificação há uma lista com as diferentes siglas de cada antibiótico. Realizada a leitura, o resultado deve ser anotado em ata de acordo com sensibilidade da bactéria a cada antibiótico; podendo ser sensível, intermediário ou resistente.



Figura 24 - Resultado do antibiograma após incubação de 24 horas.

Fonte: Arquivo Pessoal/Rafael Marques

3.9. Cultura fúngica

Na rotina de exames fúngicos do laboratório as amostras que chegam com mais frequência são: pelos para a análise de fungos dermatófitos e secreções auriculares com suspeita de *Malassezia* spp.

3.9.1. Cultura de fungos dermatófitos

Os fungos dermatófitos apresentam biotropismo por tecidos e estruturas queratinizadas como pelos, unhas e pele (MEDEIROS et al, 2009).

A cultura dos fungos dermatófitos é realizada em ágar micobiótico®, na qual se colocam os pelos em um tapete que é colocado sobre o ágar, em seguida faz-se a identificação da placa, com o nome do animal, data do processo e página na qual a ficha do animal foi fixada na ata. A placa fica armazenada por 21 dias. E será feita a leitura, para verificar se houve ou não crescimento fúngico e, que seja identificado o fungo. Na realização da leitura, prepara-se uma lâmina de microscópio, com uma

gota de Azul de Metileno. Esfrega-se um pedaço de fita adesiva transparente na bordas da cultura fúngica, com auxílio de uma pinça previamente flambada, e então coloca-se a fita adesiva em contato com o corante na lâmina, que agora já pode ser observada ao microscópio óptico em um aumento de 400 vezes.

3.10. Exame citológico

Diferentes métodos microscópicos são empregados para observação dos microrganismos, entre esses métodos está a microscopia ótica, que é usada para demonstração da morfologia e do tamanho de bactérias e fungos corados. A afinidade pela coloração pode permitir uma classificação preliminar de bactérias, enquanto a morfologia da estrutura do fungo permite a identificação do gênero (QUINN, 2005).

Na rotina de exames citológicos do laboratório as amostras mais comuns são secreções auriculares, para avaliar se há presença de bactérias ou *Malassezia* spp., e amostras de urina para verificar se há a presença de *Leptospira* spp.

3.10.1. Citologia de amostras de ouvido

As lâminas que chegam ao laboratório devem estar devidamente identificadas. Essas lâminas passam por um processo de coloração de Gram e em seguida são observadas ao microscópio óptico, onde será avaliado se há a presença de bactérias, e identificação da morfologia das mesmas, ou *Malassezia* spp., em seguida é emitido um laudo com o resultado da observação.

3.10.2. Exame de campo escuro para verificação de *Leptospira* spp.

As leptospiros são bacilos helicoidais, móveis e aeróbicos. São gram-negativos e fracamente corados com corantes de anilina. Deve ser empregado microscópio de campo escuro para visualizar leptospiros não-corados. Pode ocorrer a demonstração direta de leptospiros por exame de campo escuro do

sangue, LCR ou da urina, sendo que os exames de LCR e da urina são menos enganosos (KONEMAN et al, 2001).

As amostras de urina para verificação de presença de *Leptospira* spp. devem ter sido colhidas com no máximo 15 minutos até o momento do exame. Para realizar o exame, deve se utilizar luvas de procedimento. Uma gota da urina é colocada em uma lâmina de vidro e coberta por uma lamínula, que será observada em microscopia de campo escuro. Caso seja visualizada alguma *Leptospira* spp. o exame é positivo.

4. Considerações finais

O estágio supervisionado no laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da Universidade de Brasília foi de extrema importância para que tivesse um maior conhecimento teórico e prático sobre as diversas atividades realizadas pelos laboratórios de microbiologia médica veterinária. E compreender da importância do trabalho realizado em tais laboratórios no auxílio às diversas áreas da medicina veterinária.

Além disso foi muito proveitoso entender a necessidade do adequado acondicionamento das amostras que serão direcionadas aos exames microbiológicos e da importância de se respeitar as normas de biossegurança envolvidas no laboratório.

E sobretudo a oportunidade de se colocar em prática conceitos que foram vistas durante a graduação e que poderão ser muito úteis na vida profissional.

5. Referências bibliográficas:

BIOBRÁS DIAGNÓSTICOS. **Catálogos de Meios de Cultura. Biobrás SA.**

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos.** Módulo 4. 2004. Disponível no site http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/microbiologia/mod_4_2004.pdf. Acesso em 26 de Novembro de 2014.

KONEMAN, E.W. **Dianóstico Microbiológico - Texto e Atlas Colorido.** 5ª edição. Editora MEDSi. 2001.

LEVINSON, W. **Microbiologia médica e imunologia.** 4ª edição. Editora ARTMED. 1998.

MARTINS, G.P. **Procedimento Operacional Padrão do Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da Universidade de Brasília, número 53, Protocolo de coloração de Gram.** Brasília, 2012.

OLIVEIRA, S. J. **Microbiologia Veterinária Guia Bacteriológico Prático.** 2ª edição. EDITORA DA ULBRA. Canoas, 2000.

OXOID. **Manual Oxoid.** 1ª edição (português). 2000.

FILHO, L.C.P.R. **Atividades desenvolvidas no Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da FAV - UnB.** Brasília, 2013.

QUINN, P.J; CARTER, M.E; MARKEY, B; CARTER, G.R; **Clinical Veterinary Microbiology.** Editora WOLFE. Dublin, 1994.

QUINN, P.J; MARKEY, B.K; CARTER, M.E; DONNELLY, W.J; LEONARD, F.C;

Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas. Editora ARTMED. Porto Alegre, 2005.

SANGIONE, L. A.; PEREIRA, D. I. B.; VOGEL, F. S. F.; BOTTON, S. A. **Princípios de Biossegurança Aplicados aos Laboratórios de Ensino Universitário de Microbiologia e Parasitologia.** Ciência Rural, v.43, n.1, jan, 2013.

SARDINHA, L. **Descrição das atividades realizadas no Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária do Hospital Veterinário da Universidade de Brasília.** Brasília, 2013.

SILVA, G. N, FILHO; OLIVEIRA, V. L. **Microbiologia Manual de Aulas Práticas.** EDITORA DA UFSC. Florianópolis, 2007.