

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - FACULDADE DE AGRONOMIA E
MEDICINA VETERINÁRIA**

Igor De Costa Farage Fonseca

**Relato das atividades realizadas no laboratório de microbiologia
veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária –
UnB**

**Brasília
2015**

Igor De Costa Farage Fonseca

**Relato das atividades realizadas no laboratório de microbiologia
veterinária do hospital veterinário – UnB**

Relatório de estágio apresentado a faculdade de
agronomia e medicina veterinária da
Universidade de Brasília para a conclusão do
Curso de Medicina Veterinária

Orientadora: Profa. Dra. Simone Perecmanis

Brasília

2015

Igor De Costa Farage Fonseca

**Relato das atividades realizadas no laboratório de microbiologia veterinária do
hospital veterinário – UnB**

Relatório de estágio apresentado a faculdade de
agronomia e medicina veterinária da Universidade
de Brasília para a conclusão do Curso de Medicina
Veterinária

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Simone Perecmanis

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: _____

Assinatura: _____

M. V. Bidiah Mariano da Costa Neves

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: _____

Assinatura: _____

M. V Fernando Maidana Vital.

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: _____

Assinatura: _____

M.V. Samara Muniz Fidelis da Silva

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: _____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

A Odin, pai de todos, criador da humanidade, detentor supremo do conhecimento, das fórmulas mágicas e das runas, por ter me dado sabedoria e força em toda essa jornada.

A universidade de Brasília, todo o corpo docente da faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, direção e administração.

A minha orientadora Profa. Dra. Simone Perecmanis, pela ajuda no pouco tempo que lhe coube entre suas atividades de professora e diretora da FAV pelas suas correções e incentivos neste trabalho; e em todo o decorrer da minha vida acadêmica, me incentivando a focar e continuar no curso.

Aos meus pais e avós, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

Meus amigos, irmãos e a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha vida e formação acadêmica, o meu muito obrigado.

Aos meus animais de estimação, Scotch, Freya e todos anteriores. Por suas demonstrações de amor incondicional, me fazendo escolher seguir a profissão de médico veterinário.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. ESTRUTURA DO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA DA UNB	2
2.1. Laboratório (Setor de Bacteriologia e Micologia).....	2
2.2. Sala de Meios (Setor de Preparos de Meios e Soluções)	5
2.3. Sala de Lavagem (Setor de Lavagem e Esterilização)	6
3. ROTINA DO LABORATÓRIO	7
4. MEIOS DE CRESCIMENTO. PREPARO E UTILIZAÇÃO.	10
4.1. Ágar sangue base®.....	10
4.2. Ágar Müller Hinton®, Ágar Müller Hinton sangue®.....	11
4.3. Ágar Sabouraud®.....	12
4.4. Ágar Micobiótico®.....	12
4.5. Ágar MacConkey®.....	13
4.6. Ágar EMB® (Eosin Methylene Blue).	13
4.7. CLED Ágar® (Cystine Lactose Electrolyt Deficient).....	14
4.8. Ágar Cetrimida®	15
4.9. Caldo Tioglicolato	15
4.10. BHI Caldo® (Brain Heart Infusion).....	16
5. PRINCIPAIS BIOQUÍMICOS E REAGENTES PARA DIAGNÓSTICO E DIFERENCIAÇÃO	17
5.1. Coloração de Gram	17
5.2. Teste do hidróxido de potássio (KOH)	18
5.3. Catalase (H ₂ O ₂).....	19
5.4. Oxidase	19
5.5. Hugh e Leifson (O/F)	20
5.6. Indol.....	22
5.7. Vermelho de metila (VM).....	23
5.8. Voges Proskauer (VP)	23
5.9. Citrato.....	24
5.10. Ágar TSI	25
6. KIRBY BAUER OU MÉTODO DE DIFUSÃO POR DISCOS (ANTIBIOGRAMA) 26	
7. DIAGNÓSTICO PARA LEPTOSPIRA SPP	27

8. BACTÉRIAS DE MAIOR FREQUÊNCIA NA ROTINA.....	28
8.1. <i>Staphylococcus</i> spp.....	28
8.2. <i>Streptococcus</i> spp	29
8.3. <i>Escherichia coli</i>	29
8.4. <i>Pseudomonas</i> spp.....	29
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	30
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFIA	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Bancada de trabalho.	3
Figura 2 - Estufa de crescimento.	3
Figura 3 - Geladeira de armazenamento de meios.	3
Figura 4 - Geladeira de material contaminado.	3
Figura 5 - Interior da geladeira de materiais contaminados.	4
Figura 6 - Capela de fluxo laminar.	5
Figura 7 - Da direita para esquerda. Microscópio óptico, microscópio de campo escuro e microscópio óptico.	5
Figura 8 - Armário de armazenamento.	5
Figura 9 - Bancada de preparo de meios	5
Figura 10 - Balança de precisão e meios sendo preparados (Erlenmeyer = Mueller Hinton e no béquer = tioglicolato).	6
Figura 11 - Da direita para esquerda: Estufa de secagem de vidraria e gaveteiro de tubos de vidro	6
Figura 12 - Tanque de lavagem de vidrarias.	6
Figura 13 – Autoclave.	6
Figura 12 - Destilador.	7
Figura 13 – Chave de identificação adaptada. Fonte: QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. Clinical Veterinary Microbiology. Dublin: Wolfe, 1994, 648p.	8

Figura 14 - placa inoculada de Ágar sangue, com presença de hemólise.	11
Figura 15 – Placa de Ágar Müller Hinton® durante um teste de antibiograma.	11
Figura 16 - Placa de Ágar Müller Hinton sangue ®.	11
Figura 17 - Placa de Ágar Sabouraud®.	12
Figura 18 - de Ágar Sabouraud® inoculada com fungos, ainda não identificados.	12
Figura 19 - Placa de Ágar Micobiotico®.	13
Figura 20 - Placa de Ágar MacConkey®.	13
Figura 21 - Ágar EMB® apresentando coloração verde metálico, característico de E. coli.	14
Figura 22 – Placa de Ágar EMB®	14
Figura 23 - placa de Ágar CLED®.	15
Figura 24 - Placa de Ágar Cetrimida®.	15
Figura 25 - Tubo com caldo Tioglicolato.	16
Figura 26 - Tubo com caldo BHI®.	16
Figura 27 - Bancada de coração de lâminas. Da esquerda para direita: cristal violeta, lugol 1%, decolorante de gram e safranina.	18
Figura 28 - Testes bioquímicos, esquerda para direita: oxidase, KOH 3% e catalase.	18
Figura 29 - Teste KOH 3% positivo.	18
Figura 30 - Testes bioquímicos, esquerda para direita: oxidase, KOH 3% e catalase	19

Figura 31 - Teste positivo para catalase.	19
Figura 32 - Testes bioquímicos, esquerda para direita: oxidase, KOH 3% e catalase	20
Figura 33 - Teste oxidase positiva. Alça de platina e fita de oxidase	20
Figura 34 - Tubos de O/F com um resultado fermentativo.	21
Figura 35 - Tubos de O/F apresentando um resultado oxidativo.	21
Figura 36 - Tubos de O/F apresentando um resultado não reativo para a utilização da glicose.	21
Figura 37 - Tubo com resultado positivo para o teste de indol.	22
Figura 38 - Tubo com resultado positivo para VM.	23
Figura 39 - Tubo com resultado positivo para VP	24
Figura 40 - Tubo com teste citrato positivo.	25
Figura 41 - Teste do TSI, tubo apresentando uma bactéria que fermenta todos os açúcares e que produz gás.	26
Figura 42 - Teste do TSI, bactéria fermenta todos os açúcares	26
Figura 43 - Antibiograma em Ágar Müller Hinton®.	27
Figura 44 - Antibiograma feito em Ágar Müller Hinton®.	27
Figura 45 - Antibiograma feito em Ágar Müller Hinton sangue®.	27

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Resultados dos exames do primeiro semestre de 2015.

10

Resumo

Este relatório tem como objetivo apresentar as atividades realizadas no Laboratório de Microbiologia Veterinária da Universidade de Brasília, durante o período de estágio supervisionado do estudante Igor De Costa Farage Fonseca, no 1º período letivo de 2015. Nele constam as principais atividades executadas pelo estudante no laboratório, a saber: lavagem, produção de meios e toda a cadeia de atividades envolvida na identificação dos micro-organismos causadores de enfermidades, além de apresentar informações sobre os principais meios de cultura, bioquímica e procedimentos realizados na rotina das atividades do laboratório e dos micro-organismos mais isolados pelo estudante durante seu estágio.

Abstract

This report aims to present the activities carried out in the laboratory of Veterinary Microbiology at the University of Brasilia, during the period of supervised internship of the student Igor Costa Farage Fonseca, in the first term of 2015. It lists the main activities performed by the student at the laboratory, namely: washing, media production and the entire chain of activities involved in the identification of disease-causing micro-organisms, in addition to presenting information on the main culture media, biochemistry, procedures performed in routine activities of the laboratory and of most isolated microorganisms by the student during his internship

1. INTRODUÇÃO

Esse relatório tem como objetivo informar as atividades de estágio obrigatório supervisionado, que foram realizadas no laboratório de microbiologia veterinária da Universidade de Brasília (UNB), no período do primeiro semestre do ano de 2015. Tais atividades consistiram no recebimento de amostras e no seu processamento, a fim de identificar micro-organismos.

Micro-organismos são definidos como qualquer organismo, microscópico ou ultramicroscópico, como as bactérias, algas cianofíceas, fungos, leveduras, protistas e vírus e são encontrados em grandes quantidades em todos os ambientes, incluindo solo, água e ar, e tem participação ativa em funções vitais observadas em diversas formas de vida, seja em simbiose, vivendo mutuamente ou de forma oportunista causando doenças e desequilíbrio fisiológico. (KONEMAN et al. 2001)

A realização do diagnóstico microbiológico laboratorial contribui para a identificação dos agentes patogênicos causadores de doenças infecciosas, e este diagnóstico é influenciado pela espécie do micro-organismo, histórico do paciente, estágio da doença e cuidados durante a coleta do material, levando a escolha do melhor tratamento e seleção de antibióticos mais apropriados. (QUINN et al. 1994)

Dessa forma é de suma importância associar o exame microbiológico ao contexto da amostra, ou seja, a um histórico clínico completo com idade, sexo, espécie, quantidade e quais espécies estão em contato, ao número de animais afetados e aos tratamentos realizados, que devem acompanhar a amostra junto a uma suspeita clínica. Caso haja a falta dessas informações, os procedimentos importantes para a detecção e identificação do patógeno. (QUINN et al. 2005)

Portanto, o diagnóstico microbiológico rápido e eficiente se faz necessário, já que as enfermidades infecciosas dos animais e as zoonoses, em particular as de natureza epizootica, estão adquirindo uma importância cada vez maior nos países industrializados e em desenvolvimento. Ressalta-se ainda sua importância, pois algumas enfermidades infecciosas emergentes podem ultrapassar rapidamente a esfera local e passar dos animais às pessoas, assim, necessitando de agilidade e eficiência no diagnóstico (OIE, 2015).

2. ESTRUTURA DO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA DA UNB

O estágio obrigatório supervisionado foi realizado no laboratório de microbiologia veterinária da UNB, localizado na L4 norte, no Hospital Veterinário de Pequenos Animais, durante o período de 2 de fevereiro de 2015 a 7 de julho de 2015.

O laboratório dispõe de 3 técnicos, a saber: Cleia Nunes Malheiro de Oliveira, Maurício Macedo Rodrigues e Hudson Holanda de Andrade; 3 residentes: Bidiah Mariano da Costa Neves, Fernando Maidana Vital e Samara Muniz Fidelis da Silva; e, como responsável pelo laboratório, a professora Dra. Simone Perecmanis.

A estrutura do laboratório é dividida em 3 salas:

- Laboratório, composto pelo Setor de Bacteriologia e Micologia;
- Sala de Meios, composto pelo Setor de Preparos de Meios e Soluções;
- Sala de Lavagem, composto pelo Setor de Lavagem e Esterilização.

2.1. Laboratório (Setor de Bacteriologia e Micologia)

O Setor de bacteriologia e micologia é onde se recebem amostras e se faz a análise desses materiais. Nesse setor é onde as amostras são semeadas, classificadas, identificadas e é feito o antibiograma.

Este setor possui duas bancadas para a manipulação das amostras devidamente recebidas.

Cada bancada possui um bico de Bunsen, utilizado para esterilizar com calor as alças e também promover uma proteção para quem estiver manuseando as amostras; aqui, também, se encontram duas estufas que são usadas para fornecer temperatura e ambiente favoráveis ao crescimento dos micro-organismos; geladeiras cada uma com função diferente: uma para armazenar material estéril, uma para armazenar meios prontos que serão utilizados na rotina e uma utilizada para manter material contaminado e as placas que ainda estão sendo usadas na rotina. Todos esses equipamentos estão representados nas figuras 1, 2, 3, 4 e 5.



Figura 1 - Bancada de trabalho. Fonte: acervo pessoal



Figura 2 - Estufa de crescimento. Fonte: acervo pessoal.



Figura 3 - Geladeira de armazenamento de meios. Fonte: acervo pessoal.



Figura 4 - Geladeira de material contaminado. Fonte: acervo pessoal



Figura 5 - Interior da geladeira de materiais contaminados. Fonte: acervo pessoal

Uma capela de fluxo laminar, utilizada para criar um ambiente estéril para distribuição de meios que vieram da autoclave evitando assim contaminação do ambiente externo; três microscópios, utilizados para a visualização de micro-organismos e classificação de Gram, um desses microscópios é um microscópio de campo escuro, utilizado para visualização de amostras suspeitas para *Leptospira*. Esses equipamentos são representados nas figuras 6 e 7.



Figura 6 - Capela de fluxo laminar. Fonte: acervo pessoal.



Figura 7 - Da direita para esquerda. Microscópio óptico, microscópio de campo escuro e microscópio óptico. Fonte: acervo pessoal.

2.2. Sala de Meios (Setor de Preparos de Meios e Soluções)

Na sala de meios são armazenados, pesados e diluídos as bases, substratos e materiais dos meios e soluções utilizados no dia a dia do laboratório.

Esse setor do laboratório dispõe de: um armário de armazenamento, onde são dispostas todas as bases dos meios; uma balança de precisão, bailarina e micro-ondas; uma estufa para a secagem da vidraria e é nesse setor onde são armazenados todos os tubos de vidro que serão utilizados para os testes bioquímicos. Esses equipamentos e materiais são evidenciados nas figuras 8, 9, 10 e 11.



Figura 8 - Armário de armazenamento. Fonte: acervo pessoal.



Figura 9 - Bancada de preparo de meios. Fonte: acervo pessoal.



Figura 10 - Balança de precisão e meios sendo preparados (Erlenmeyer = Mueller Hinton e no béquer = tioglicolato). Fonte: acervo pessoal.



Figura 11 - Da direita para esquerda: Estufa de secagem de vidraria e gaveteiro de tubos de vidro. Fonte: acervo pessoal.

2.3. Sala de Lavagem (Setor de Lavagem e Esteriliza o)

Na sala de lavagem são lavadas todas as vidrarias que são usadas no laboratório e   nesta sala de lavagem que também se encontra o autoclave, cuja fun o   esterilizar materiais com alta pressão e temperatura por determinado tempo. Nesta mesma sala também fica o destilador, onde a água   destilada para se obter um nível alto de desmineraliza o. Esses equipamentos são observados nas figuras 12, 13 e 14.



Figura 12 - Tanque de lavagem de vidrarias. Fonte: acervo pessoal.



Figura 13 – Autoclave. Fonte: acervo pessoal



Figura 14 - Destilador. Fonte: acervo pessoal.

3. ROTINA DO LABORATÓRIO

Existem diversas tarefas na rotina do laboratório, que envolvem desde o cultivo de bactérias até o descarte do material contaminado. Neste relatório serão descritas três atividades de suma importância do laboratório, a saber, o processamento das amostras, desde o seu recebimento até a obtenção do resultado final, a limpeza de vidraria e a produção dos meios.

O processamento das amostras se inicia no recebimento. Ao receber qualquer amostra deve-se observar atentamente como essa foi armazenada, que tipo de material foi enviado, como esse material foi coletado e observar o preenchimento da ficha, dando muita atenção para o histórico clínico, a suspeita clínica, a origem do material e se o animal está recebendo algum tipo de tratamento. Isso tudo é muito importante para orientar todo o processo de identificação do micro-organismo, prevenindo qualquer dificuldade durante o processo e minimizando os possíveis erros. Por exemplo, os materiais coletados sem cuidados básicos de esterilização e as fichas mal preenchidas podem dificultar e confundir todo o processo de identificação.

Após o recebimento da amostra, essas são inoculadas nos meios referentes a pesquisa do micro-organismo suspeito e levadas para a estufa a 37^o C para esperar seu crescimento. No caso de amostras líquidas, além da inoculação em meio sólido também é feita uma semeadura em meio líquido. Após aproximadamente 24 horas as placas são verificadas para observação de crescimento de algum micro-organismo. E, em caso de ausência de crescimento, o inóculo permanece por mais 24 horas em estufa a 37^oC. O descarte do inóculo só será realizado após 72 horas de incubação com ausência de crescimento.

Em caso de crescimento de micro-organismos, se iniciam os processos básicos que consistem em observar as características das colônias, realizar os testes de oxidase, catalase e KOH. Uma lâmina é confeccionada para coloração de Gram a fim de se observar as características morfotintórias da bactéria. Após essa prévia identificação são escolhidos os testes bioquímicos mais adequados para a identificação definitiva do micro-organismo, com a utilização da tabela com a chave de identificação inicial (Figura 15). Depois da identificação bioquímica é realizado o antibiograma, teste que consiste em verificar a sensibilidade da bactéria isolada aos antimicrobianos, assim indicando para o clínico a escolha do melhor antibiótico/quimioterápico a ser usado no tratamento do paciente.

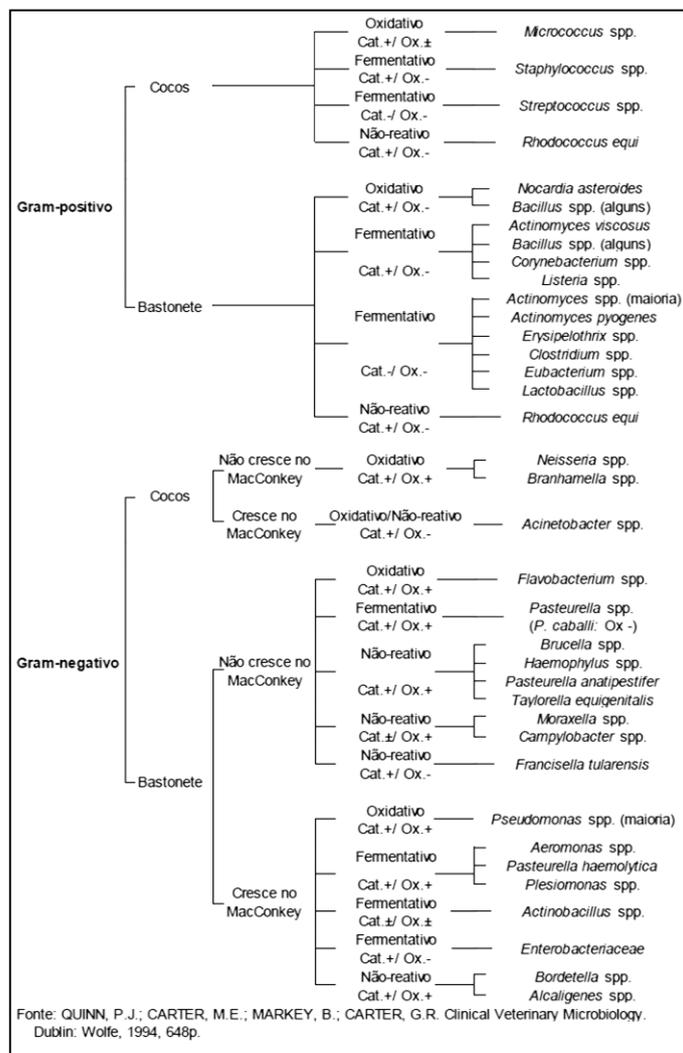


Figura 15 – Chave de identificação adaptada. Fonte: QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. Clinical Veterinary Microbiology. Dublin: Wolfe, 1994, 648p.

A limpeza e higiene das vidrarias consiste primeiramente na autoclavação de todo o material sujo e contaminado usado na rotina do laboratório. Em seguida realiza-se uma primeira lavagem retirando a grande quantidade de resíduos, seguida da imersão dessa vidraria em uma mistura desencrustante por pelo menos 24 horas. Ao término desse período é feita uma nova lavagem para tirar resíduos do desencrustante seguida de enxágue com água destilada. Por fim, toda a vidraria é colocada para secar em uma estufa com temperatura de 60° C.

As bases para a confecção dos meios, tanto sólidos como líquidos, são armazenadas no armário que se encontra na sala de meios, e se encontram identificadas, numeradas e organizadas para serem facilmente utilizadas. O preparo é realizado de acordo com a diluição indicada pelo fabricante, com água destilada obtida no próprio laboratório. Os meios sólidos são preparados em Erlenmeyers vedados e levados ao autoclave por 15 minutos a 121°C. No caso de soluções líquidas, a solução é preparada em um béquer e ainda na sala de meios é distribuída em tubos com tampa, que depois serão levados à autoclave para passar pelo mesmo ciclo anterior. Em poucos casos que se faz a adição de uma substância, como a glicose e a ureia, que não pode passar pelo ciclo da autoclave. A solução é preparada normalmente e vai ao autoclave, depois levada ao fluxo laminar, para minimizar qualquer risco de contaminação, onde é adicionada a substância e então é distribuída nos tubos.

Durante a rotina do primeiro semestre de 2015, teve-se um total de 222 amostras foram analisadas, que poderia ter sido maior, porém devido ao problema da falta de material do hospital, acarretou numa diminuição nos exames. Dentre os exames analisados foram identificados 16 *Bacillus* spp, 4 *Pasteurella* spp, 8 *Corynebacterium* spp, 64 *Staphylococcus* spp, 12 *Proteus* spp, 10 *Enterobacter agglomerans*, 31 *Escherichia coli*, 2 *Aeromonas* spp, 4 *Rhodococcus* spp, 7 *Pseudomonas* spp, 12 *Streptococcus* spp, 3 *klebsiella oxitoca*, 2 *Yersinia enterocolitica*, 1 *Bordetella* spp, 2 *Alcaligenes*, 1 *Arcanobacterium pyogenes*, 1 *Serratia liquefaciens*, 1 *Plesiomonas* (Gráfico 1). Em 80 amostras enviadas não houve crescimento, ou não se obteve um resultado conclusivo. O total de micro-organismos identificados não foi igual ao

número de amostras analisadas pelo fato de algumas amostras terem mais de uma bactéria atuando na infecção.

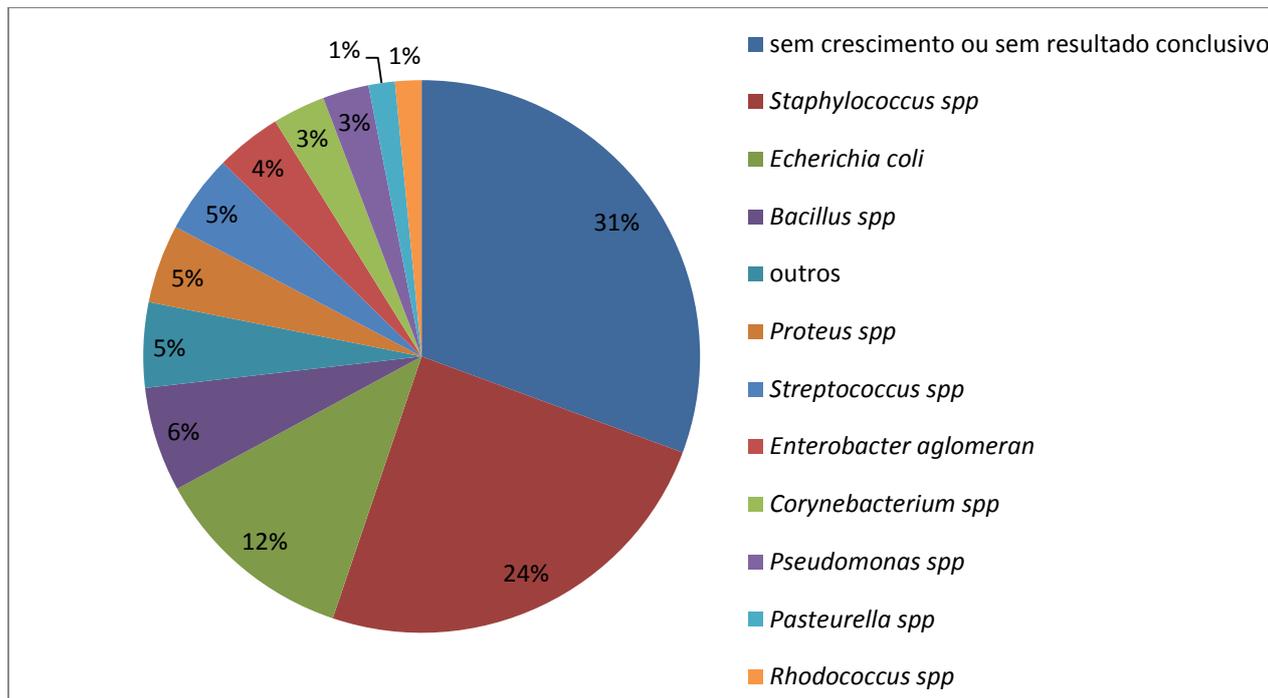


Gráfico 1 – Resultados dos exames do primeiro semestre de 2015. Fonte: acervo pessoal.

4. MEIOS DE CRESCIMENTO. PREPARO E UTILIZAÇÃO.

Os meios de cultura que são mais frequentemente utilizados na rotina do laboratório são o ágar sangue Base®, ágar MacConkey®, ágar EMB® (Eosin Methylene Blue), Cetrimida®, ágar Sabouraud®, ágar micobiótico®, ágar CLED® (cystine lactose eletrolytedeficiente), Müller Hinton®, caldo Tioglicolato®, BHI caldo.

4.1. Ágar sangue base®

O ágar sangue® é um meio de cultura altamente nutritivo para a maioria dos micro-organismos fastidiosos proporcionando um bom crescimento sendo considerado o ágar padrão inicial para cultura bacteriana no laboratório. A presença de sangue também é usada na determinação da atividade hemolítica (OXOID, 2000).

Após a autoclavagem, o Ágar sangue base® é resfriado até a temperatura de 45°C. a 50°C e levado à capela de fluxo laminar onde é adicionado 5%, do

volume da solução, em sangue de carneiro, (BIOBRÁS, 2013). Na Figura 16 encontra-se uma placa utilizada na rotina do laboratório.



Figura 16 - placa inoculada de ágar sangue, com presença de hemólise. Fonte: acervo pessoal.

4.2. Ágar Müller Hinton®, Ágar Müller Hinton sangue®

Esse Ágar é escolhido para o teste antibiograma (teste de sensibilidade a antimicrobianos) pela técnica de difusão de disco devido a sua confiabilidade. Isso, porque este Ágar apresenta uma baixa concentração de timina e timedina, inibidores de sulfonamida, trimetropima e tetraciclina. Altas concentrações de timina e timedina inibem a sulfonamida e a trimetropima gerando assim halos muito pequenos ou inexistentes interferindo com a interpretação do teste. (QUINN, 1994) É considerado um meio propício para o crescimento da maioria dos micro-organismos. No caso de Ágar Müller Hinton sangue® é acrescentado 5% do volume da base em sangue (BIOBRÁS, 2013). Figuras 17 e 18



Figura 17 – Placa de Ágar Müller Hinton® durante um teste de antibiograma. Fonte: acervo pessoal.



Figura 18 - Placa de Ágar Müller Hinton sangue®. Fonte: acervo pessoal.

4.3. Ágar Sabouraud®

É um meio com pH baixo, utilizado para o isolamento de fungos dermatófitos, outros fungos e leveduras (OXOID, 2000). É utilizado no isolamento, identificação e conservação de fungos patogênicos e saprófitas. Em casos de material muito contaminado para inibir o crescimento de outros micro-organismos alguns Ágar são acrescidos de antimicrobianos como cloranfenicol, penicilina e estreptomicina. O Sabouraud é um meio de peptona suplementado com dextrose para suporte do crescimento de fungos. As peptonas são fontes de fatores de crescimento nitrogenados. A dextrose proporciona uma fonte de energia para o desenvolvimento de micro-organismos (BIOBRÁS, 2013). No laboratório é normal que o material utilizado nesse Ágar seja inoculado em duas placas, uma segue para a estufa e a outra é colocada em temperatura ambiente. Figura 19 e 18

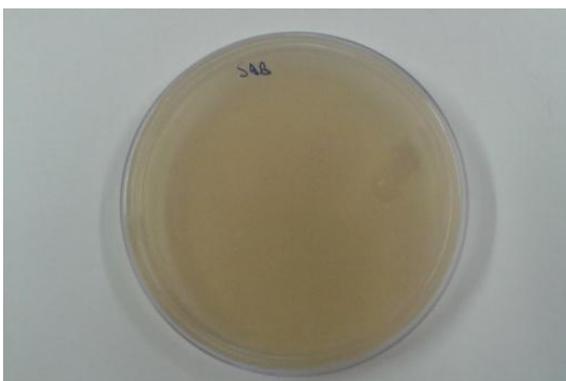


Figura 19 - Placa de Ágar Sabouraud®. Fonte: acervo pessoal.



Figura 20 - de Ágar Sabouraud® inoculada com fungos, ainda não identificados. Fonte: acervo pessoal.

4.4. Ágar Micobiótico®

O ágar Micobiótico® é um meio de cultura específico para o crescimento de fungos patogênicos provenientes de materiais que possuem uma variedade de outros micro-organismos e que devem ter o crescimento inibido. Este meio contém nutrientes fornecidos pelas peptonas, glucose, que é uma fonte de energia em sua composição, cicloheximida, que é um inibidor de fungos não

patogênicos (BIOBRÁS, 2013). Esse Ágar quando inoculado é deixado em temperatura ambiente e só é analisado após, no mínimo, 15 dias.

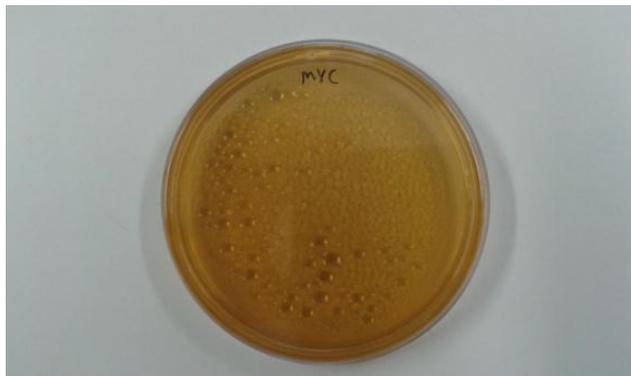


Figura 21 - Placa de Ágar Micobiótico®. Fonte: acervo pessoal.

4.5. Ágar MacConkey®

O ágar MacConkey® contém sais biliares e cristal violeta, que inibem o crescimento de bactérias Gram-positivas (ANVISA, 2013). Esse meio de cultura contém também lactose e o indicador de pH vermelho de fenol neutro, que cora em rosa os micro-organismos que fermentam a lactose, produzindo metabólitos ácidos (QUINN et al., 1994). Após a classificação das bactérias, durante a rotina, as bactérias Gram negativas são inoculadas nesse Ágar para se observar o seu crescimento.



Figura 22 - Placa de Ágar MacConkey®. Fonte: arquivo pessoal

4.6. Ágar EMB® (Eosin Methylene Blue).

É um meio seletivo para isolamento e diferenciação de bastonetes Gram negativos (Enterobactérias entre outros). Este ágar contém corantes de eosina e azul de metileno que inibem as bactérias Gram positivas, funcionam também

como indicadores de diferenciação entre bactérias fermentadoras ou não de lactose, por exemplo, a bactéria *Escherichia coli* apresentará colônias de coloração verde metálico, enquanto que as colônias de *Salmonella* spp e *Shigella* spp possuem o crescimento incolor nesse ágar (BIOBRÁS, 2013). Esse Ágar é mais utilizado para a identificação de *E. coli*, sempre que no Ágar MacConkey apresentar colônias rosadas, fermentadoras de lactose, e houver alguma suspeita de que a bactéria seja uma *E. coli*, utilizamos esse meio para confirmar ou descartar as suspeitas. Figuras 23 e 24



Figura 23 - Ágar EMB® apresentando coloração verde metálico, característico de *E. coli*. Fonte: acervo pessoal.

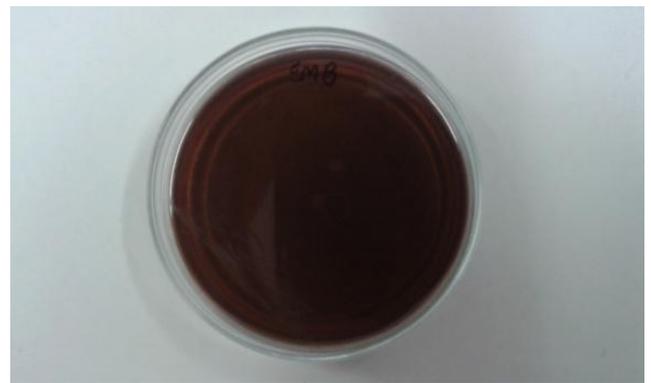


Figura 24 - Placa de Ágar EMB® Fonte: acervo pessoal.

4.7. CLED Ágar® (Cystine Lactose Electrolyt Deficient)

O ágar CLED® (Cistina-Lactose-Deficiente em Eletrólitos) é recomendado para exames bacteriológicos de urina, pois permite o crescimento dos microorganismos potencialmente patogênicos presentes na urina (OXOID, 2000). Esse meio de cultura inibe o crescimento em véu de colônias de *Proteus* spp (BIOBRÁS, 2013). Colônias fermentadoras de lactose adquirem coloração amarelada e colônias não fermentadoras de lactose adquirem coloração azulada. Por inibir o crescimento em nuvens do *Proteus* spp, esse Ágar é sempre utilizado no isolamento de bactérias que estão crescendo junto com o *Proteus* spp. Figura 25



Figura 25 - placa de Ágar CLED®. Fonte: acervo pessoal.

4.8. Ágar Cetrimida®

O ágar Cetrimida® favorece o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* e a produção de piocianina. As colônias de *P. aeruginosa* tem coloração verde azulada e ficam fluorescentes na luz negra, devido à produção de fluoresceína (BIOBRÁS, 2013). A piocianina é um pigmento verde produzido por cerca de 98% das cepas de *P. aeruginosa*, constituindo um fator importante para sua identificação, visto que nenhuma outra bactéria não fermentadora produz esse pigmento (KONEMAN et al., 2001). Figura 26



Figura 26 - Placa de Ágar Cetrimida®. Fonte: acervo pessoal.

4.9. Caldo Tioglicolato

É um meio de cultivo de micro-organismos aeróbios e anaeróbios. É considerado um meio tamponado, portanto inóculos ácidos ou alcalinos não produzem interferência significativa no meio, pois o teor de tioglicolato neutraliza o efeito bacteriostático contribuindo para o crescimento de micro-organismos (OXOID, 2000). Outra função do tioglicolato é a de estabelecer um nível baixo

de tensão de oxigênio, já que é um agente redutor, o que favorece o crescimento de micro-organismos anaeróbios e microaerófilos (BIOBRÁS, 2013). No laboratório é utilizado sempre esse caldo quando há amostras de urina, sendo que essa amostra de urina é inoculada em Ágar sangue e no tioglicolato quando é recebida. Figura 27



Figura 27 - Tubo com caldo Tioglicolato. Fonte: acervo pessoal.

4.10. BHI Caldo® (Brain Heart Infusion)

O caldo BHI® (*Brain Heart Infusion*) é um meio derivado de nutrientes de cérebro, coração, peptona e dextrose (ANVISA, 2013). É usado na recuperação de micro-organismos fastidiosos ou não, incluindo bactérias aeróbicas, anaeróbicas e fungos (MBIOLOG, 2015). Esse caldo é extremamente nutritivo, auxiliando para que bactérias fracas tenham condições para se recuperar e assim ser possível fazer todo o diagnóstico e identificação. Figura 28



Figura 28 - Tubo com caldo BHI®. Fonte: acervo pessoal.

5. PRINCIPAIS BIOQUÍMICOS E REAGENTES PARA DIAGNÓSTICO E DIFERENCIAÇÃO.

5.1. Coloração de Gram

A coloração de Gram é a mais usada técnica de coloração na bacteriologia e permite dividir as bactérias em Gram-positivas e Gram-negativas, que adquirem, respectivamente, coloração azul e rosa (OLIVEIRA, 2000).

A coloração de Gram é precedida pela montagem de um esfregaço em lâmina de vidro identificada, para onde transfere-se, com a ajuda da alça bacteriológica, uma gota de solução salina estéril, e ainda com o auxílio da alça é coletada uma pequena quantidade de colônias da bactéria proveniente da placa de Ágar que é então misturada com a solução salina e espalhada em movimentos circulares na superfície da lâmina que será fixada por calor em bico de Bunsen. Essa lâmina fixada segue então para o processo de coloração. Primeiro é depositado sobre ela o cristal violeta, que permanecendo por 1 minuto sendo retirado o excesso, em seguida cobre-se a lâmina com o reagente lugol, que também permanecendo por 1 minuto sendo retirado o excesso, a lâmina então é lavada com álcool absoluto por volta de 10 segundos, que é retirado com água corrente rapidamente, e a coloração é encerrada então é com a cobertura da lâmina com a safranina que permanecerá por 15 segundos. Por fim a lâmina é lavada com água corrente, e deixada secar naturalmente. Somente após o processo de coloração, a lâmina é levada ao microscópio, em aumento de 1000x e olho de imersão, para se observar as bactérias, cuja coloração azul escuro ou violeta indica a presença de bactérias Gram positivas e caso sejam visualizadas bactérias coradas em rosa ou vermelho, as mesmas são identificadas como Gram negativas. Figura 29



Figura 29 - bancada de coração de lâminas. Da esquerda para direita: cristal violeta, lugol 1%, decolorante de gram e safranina. Fonte: acervo pessoal.

5.2. Teste do hidróxido de potássio (KOH)

Deve-se observar mudança na viscosidade do conteúdo em aproximadamente 30 segundos levantando a alça bacteriológica para evidenciar a formação de um fio viscoso. A parede das bactérias Gram negativas não é resistente à solução de KOH 3% ocorrendo a lise celular, o DNA então reage com o KOH 3% tornando o líquido viscoso. A parede das bactérias Gram positivas é resistente ao KOH 3%, por isso não ocorre a lise celular e o material não adquire viscosidade (QUINN et al, 1994). O teste é feito despejando uma gota do KOH 3% sobre uma lâmina. Com o auxílio de uma alça é coletado uma quantidade de colônias da bactéria e se mistura com a gota em cima da lâmina. Caso o teste seja positivo, levantando a alça é possível observar a formação de um fio entre a lâmina e a alça, caso o teste seja negativo não se observa esse fio viscoso. Figura 30 e 31



Figura 30 - Testes bioquímicos, esquerda para direita: oxidase, KOH 3% e catalase. Fonte: acervo pessoal.



Figura 31 - Teste KOH 3% positivo. Fonte: acervo pessoal.

5.3. Catalase (H₂O₂)

O teste da catalase indica a presença ou não de enzima catalase nas células bacterianas (OLIVEIRA, 2000). A catalase é produzida por diversas bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas e faz a quebra do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em oxigênio e água (QUINN et al., 1994). O resultado positivo do teste traduz-se pela formação de bolhas quando se coloca uma alçada de colônias em contato com o peróxido de hidrogênio (OLIVEIRA, 2000). O teste consiste em colocar uma gota de H₂O₂ (água oxigenada) sobre uma lâmina, novamente com uma alça é coletada uma quantidade de colônias da bactéria e pondo em contato com a gota na lamínula, caso seja negativa não acontecerá nada com o líquido, já em casos positivos é observado formação de bolhas junto à alça. Qualquer formação de bolhas, independente da quantidade e do tamanho das bolhas já é considerado catalase positiva. Figura 32 e 33



Figura 32 - Testes bioquímicos, esquerda para direita: oxidase, KOH 3% e catalase. Fonte: acervo pessoal.

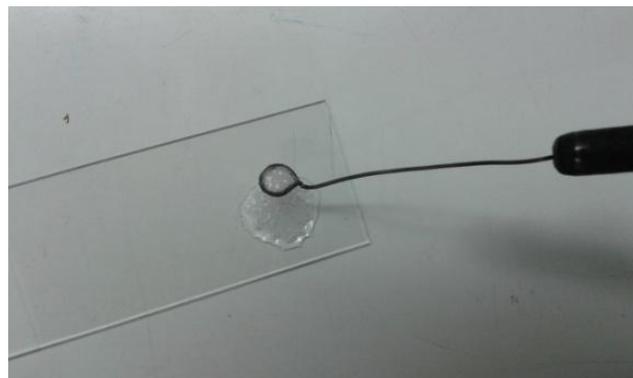


Figura 33 - Teste positivo para catalase. Fonte: acervo pessoal.

5.4. Oxidase

Este teste detecta a produção de citocromo oxidase, que geralmente está presente somente em organismos aeróbios, fazendo com que estes usem oxigênio como um receptor de hidrogênio ocorrendo, assim, a redução do oxigênio na forma molecular a peróxido de hidrogênio. (OLIVEIRA, 2000). O sistema de citocromo oxidase está presente somente em micro-organismos aeróbios, e, a maioria das bactérias Gram-positivas é oxidase negativa. O teste é considerado positivo quando a alçada com bactérias em contato com a fita faz

com que esta adquira coloração roxa-azulada. Pode-se usar como controle positivo colônias de *Pseudomonas aeruginosa* e como controle negativo, *Escherichia coli* (OLIVEIRA, 2000). O teste consiste em coletar com a alça de platina, já que a alça comum possui ferro e isso pode gerar um falso positivo, a bactéria e friccionar essa contra a fita própria do teste, caso a cor da fita mude para azul, normalmente um azul escuro bem forte, o teste é considerado positivo, caso isso não ocorra o teste é negativo. Figura 34 e 35



Figura 34 - Testes bioquímicos, esquerda para direita: oxidase, KOH 3% e catalase. Fonte: acervo pessoal.



Figura 35 - Teste oxidase positiva. Alça de platina e fita de oxidase. Fonte: acervo pessoal.

5.5. Hugh e Leifson (O/F)

O teste demonstra se a bactéria obtém energia utilizando açúcar através da fermentação ou oxidação. As bactérias fermentadoras geralmente são anaeróbias facultativas, o açúcar glicose é fosforilado em glicose-6-fosfato antes de ser fermentado. Já as bactérias oxidativas geralmente são aeróbias estritas (OLIVEIRA, 2000). Em bactérias que fazem oxidação da glicose, o tubo sem o óleo adquire coloração amarela e o tubo com óleo permanece azul ou verde, pois essas bactérias são, em geral, aeróbias estritas. Em bactérias fermentadoras de glicose, os dois tubos adquirem coloração amarela, pois, normalmente, essas bactérias são anaeróbias facultativas. O teste é considerado não reativo quando os dois tubos permanecem verdes ou azuis. Os tubos devem ser incubados na estufa de cultivo microbiológico a 37°C por até 14 dias (OLIVEIRA, 2000). O teste decorre da observação da cor do líquido de dois tubos inoculados previamente com a bactéria, sendo um acrescido de óleo mineral estéril e o outro não, auxiliado de uma alça (no laboratório utiliza-se uma alça específica para o tubo com óleo). Na figura 36 observa-se um teste com

resultado fermentativo, na figura 37 observa-se um teste com resultado oxidativo e na figura 38 um teste com resultado não reativo.

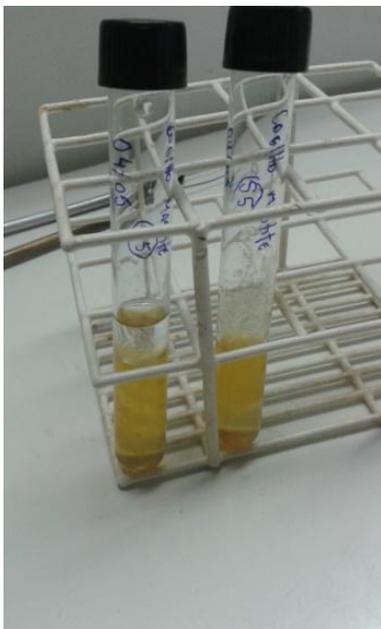


Figura 36 - Tubos de O/F com um resultado fermentativo. Fonte: acervo pessoal.

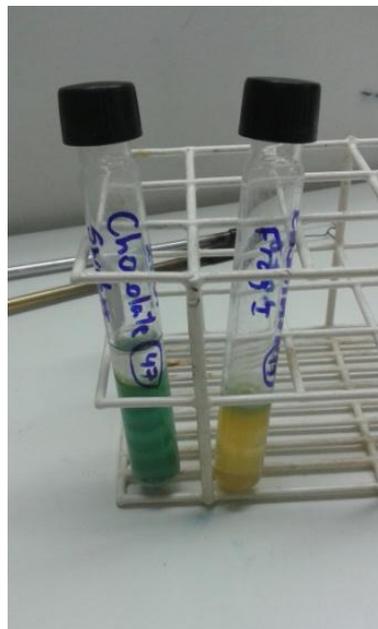


Figura 37 - Tubos de O/F apresentando um resultado oxidativo. Fonte: acervo pessoal.

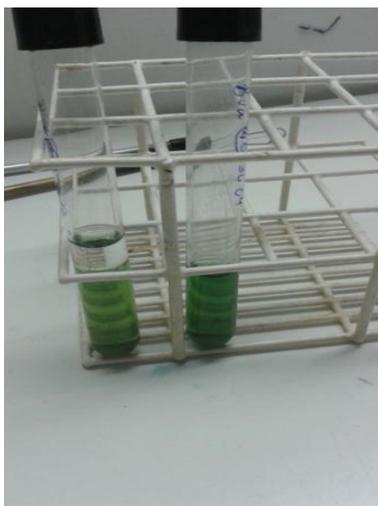


Figura 38 - Tubos de O/F apresentando um resultado não reativo para a utilização da glicose. Fonte: acervo pessoal.

5.6. Indol

O teste de indol demonstra se a bactéria possui a enzima triptofanase, que realiza a clivagem do triptofano, produzindo indol, ácido pirúvico e amônia (KONEMAN et al., 2001). Este teste serve como diferencial entre *Salmonella spp* e *Escherichia coli*, resultado negativo e positivo respectivamente (OLIVEIRA, 2000). Inicialmente inocula-se a bactéria em um caldo nutritivo, contendo 1% de triptofano e se espera por no mínimo 24 horas. Após o tempo determinado, é adicionado rapidamente, para promover a mistura dos líquidos, 1 ml de Xilol ao tubo, em seguida é adicionado, lentamente e deixando escorrer pela parede do tubo, 0,5ml de reativo de Erlich. No teste positivo irá se formar um anel vermelho entre o caldo e a concentração de xilol formada no tubo (OLIVEIRA, 2000).

Figura 39



Figura 39 - tubo com resultado positivo para o teste de indol. Fonte: acervo pessoal.

5.7. Vermelho de metila (VM)

O teste de vermelho de metila indica se a bactéria produz ácidos fortes a partir do metabolismo da glicose. O pH de 4,4 é o ponto ácido limite do indicador vermelho de metila, sendo assim, quando o pH do meio é menor que 4,4 visualiza-se uma coloração avermelhada (KONEMAN et al., 2001). A colônia bacteriana é inoculada no meio de Clark Lubs (meio VM-VP) por vinte e quatro a quarenta e oito horas. O resultado positivo é obtido quando o meio adquire coloração avermelhada ao se adicionar o indicador vermelho de metila (OLIVEIRA, 2000). Após 24 horas da inoculação da bactéria no meio, o teste é feito aplicando 5 gotas de solução de VP junto ao líquido encontrado no tubo (OLIVEIRA, 2000). É observado um tubo com resultado positivo para VM na figura 40.

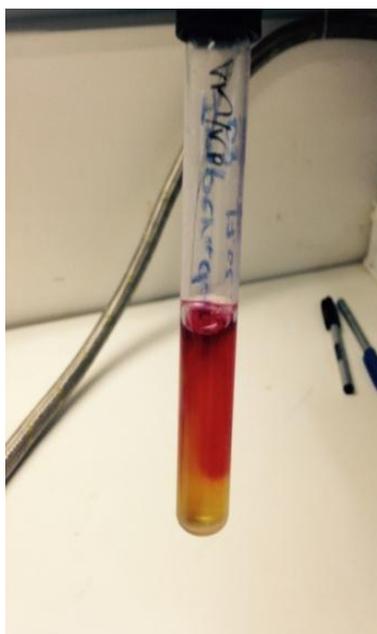


Figura 40 - tubo com resultado positivo para VM. Fonte: acervo Samara Munis Fidelis da Silva.

5.8. Voges Proskauer (VP)

Este teste mede a produção de acetilmetilcarbinol pela fermentação da glicose através da via butilenoglicólica. (OLIVEIRA, 2000). A acetoína (acetilmetilcarbinol) é convertida em diacetil, através da ação do hidróxido de potássio e do oxigênio atmosférico e adquire coloração vermelha sob a ação catalítica do α -naftol (KONEMAN et al., 2001). O teste é feito usando o mesmo

tubo que foi utilizado no VM, neste são adicionados 0.6 ml de α -nafitol a 5%, em seguida se adiciona 0.2ml de solução aquosa de VP, que consiste em solução aquosa de hidróxido de potássio a 40%, contendo 0,3% de creatina. Após agitar o tubo para misturar as substâncias, deixa-se o tubo descansando inclinado, para aumentar a superfície de contato da mistura com o ar, por aproximadamente 15 minutos. Após esse tempo se for verificada a cor vermelha o teste é considerado positivo (OLIVEIRA, 2000). Na figura 41 é observado um tubo com resultado positivo para VP.



Figura 41 - Tubo com resultado positivo para VP. Fonte: acervo pessoal.

5.9. Citrato

O meio de citrato é sólido de cor verde e em formato de bisel. A cultura bacteriana deve ser realizada na superfície do Ágar com o auxílio da alça. Algumas bactérias são capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono. Essas bactérias na ausência de fermentação ou de produção de ácido láctico podem obter energia pelo uso do citrato. Ao ocorrer esse crescimento, o meio de coloração inicial verde adquire uma coloração azul, sendo consideradas citrato

positivas. As que não alteram a coloração do meio são citrato negativas (OLIVEIRA, 2000). Figura 42



Figura 42 - tubo com teste citrato positivo.
Fonte: acervo pessoal.

5.10. Ágar TSI

O teste de TSI (*Triple Sugar Iron*) indica se a bactéria fermenta somente glicose, se fermenta glicose, lactose e sacarose, e, se produz sulfeto de hidrogênio. O meio ágar TSI contém 0,1% de glicose, 0,1% de lactose, 0,1% de sacarose, vermelho de fenol, para a detecção de fermentação de carboidratos, e sulfato de ferro, para indicar a produção de sulfeto de hidrogênio. (ANVISA, 2013). Também pode-se observar a produção de gás (OLIVEIRA, 2000). O teste é feito usando uma agulha. Depois de coletada as colônias da bactéria a ponta dessa alça é introduzida no Ágar, pelo menos até metade da profundidade deste, então retira-se lentamente e quando sai do interior do Ágar a ponta da alça é estriada pelo bisel do Ágar dentro do tubo. Os resultados são obtidos de acordo com a coloração apresentada. Caso fique amarelado no fundo é devido a uma reação ácida, e, caso fique vermelho na superfície é devido a uma reação alcalina, essa bactéria metaboliza a glicose. Caso todo o Ágar se apresente amarelo, reação ácida, a bactéria fermenta todos os açúcares presente (figura 44). Caso alguma parte do Ágar fique enegrecida a bactéria produz H₂S. Caso essa bactéria produza gás será observado formação de espaços dentro do Ágar (figura 43) (OLIVEIRA, 2000).



Figura 43 – Teste do TSI, tubo apresentando uma bactéria que fermenta todos os açúcares e que produz gás. Fonte: acervo pessoal.



Figura 44 - teste do TSI, bactéria fermenta todos os açúcares. Fonte: acervo pessoal.

6. KIRBY BAUER OU MÉTODO DE DIFUSÃO POR DISCOS (ANTIBIOGRAMA)

Nesse método são usados pequenos discos de papel de filtro impregnados com antibióticos. O diâmetro formado pela inibição do crescimento da bactéria, ocasionado pela difusão da droga no Ágar, permite classificar as bactérias como sensíveis, intermediárias ou resistentes. Uma suspensão bacteriana é inoculada em uma placa de ágar Müller Hinton® ou Müller Hinton® Sangue com um swab estéril. Deve-se assegurar que a inoculação seja distribuída por toda a extensão da placa, o swab deve ser esfregado por toda a placa, gira-se a placa e repete-se o processo. Em seguida, os discos são distribuídos com auxílio de uma pinça estéril, mantendo uma boa distância entre os centros de cada disco. As placas permanecem na estufa de cultivo microbiológico por no máximo 24 horas e são, então, examinadas (OLIVEIRA, 2000).

Somente depois da identificação do micro-organismo é feito o antibiograma. Assim que identificado, com ajuda de uma alça, colônias da bactéria são inoculadas em caldo Müller Hinton® e colocadas na estufa por cerca de 24 horas. Após o tempo de crescimento, utilizando um swab estéril, o caldo é inoculado em uma placa de Ágar Müller Hinton®, certificando que o caldo seja esfregado por toda a superfície do Ágar. Após o caldo ser inoculado são dispostos os discos de antibiótico. Estes são escolhidos de acordo com sistema e órgãos acometidos descritos no histórico do animal. Depois do tempo de

crecimento na estufa as placas são lidas. A leitura é feita medindo-se o diâmetro dos círculos formados pela inibição do crescimento das colônias e comparando com tamanhos já determinados, caso o tamanho do círculo seja menor que o padrão a bactéria é considerada resistente. Em tamanhos que sejam maiores que o pré-determinado a bactéria é considerada sensível. Em alguns casos o diâmetro fica em uma faixa intermediária entre o resistente e o sensível, nesses casos é considerado que seja de resistência intermediária. É possível evidenciar resultados de antibiogramas nas figuras 45, 46 e 47.



Figura 45 - Antibiograma em Ágar Müller Hinton®. Fonte: acervo pessoal.

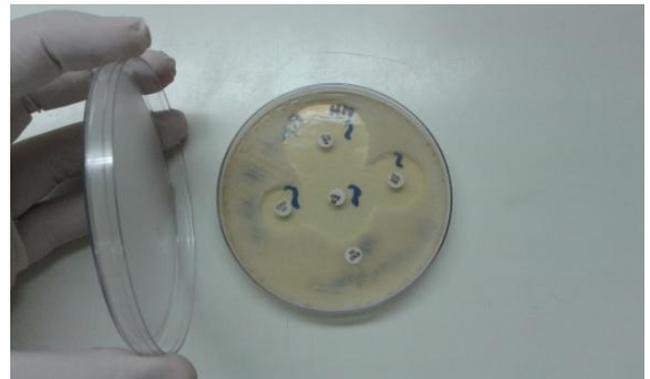


Figura 46 - antibiograma feito em Ágar Müller Hinton®. Fonte: acervo pessoal.

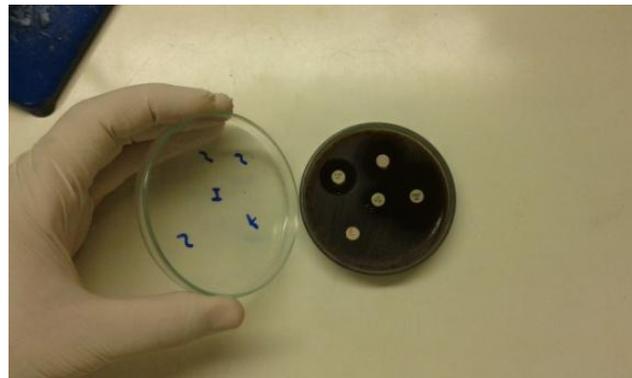


Figura 47 - Antibiograma feito em Ágar Müller Hinton sangue®. Fonte: acervo pessoal.

7. DIAGNÓSTICO PARA LEPTOSPIRA SPP

Micro-organismo da família das espiroquetas, medem de 6 até 20 micrômetros de comprimento e aproximadamente 0,1 micrômetro de diâmetro, apresentam-se em espiral, possuem estruturas em forma de gancho nas extremidades, e possuem movimentação rápida. (OLIVEIRA, 2000)

Não são visíveis por coloração de Gram. Em microscópio são visualizadas por coloração de prata (método de Levaditi e Warthin Starry), isso para cortes histológicos e em esfregaço de lâminas em coloração de Fontana. Outras colorações possíveis são as de vermelho Congo ou nigrosina. Também são visualizadas por microscopia de campo escuro. (OLIVEIRA, 2000)

Neste semestre, começou-se a aprimorar o diagnóstico de *Leptospira spp.* Antes, por visualização direta, em microscópio de campo escuro, de uma gota da urina de um animal suspeito, bastava ver uma bactéria com forma, estruturas e movimentação característica o diagnóstico era positivo. Esse procedimento causava problemas devido a sua grande quantidade de diagnósticos indefinidos.

A nova técnica de diagnóstico, consiste em distribuir a urina em microtubos de 1,5 mL, centrifugar 1,5 mL de urina a 14000G a 5°C por 20 min, desprezar o sobrenadante, em frasco identificado para descarte de resíduos, retirando delicadamente com pipeta e ponteira estéril, suspender os 2 pellets em 100µl em PBS com PH 7.4, homogeneizar o pellet no vórtex, colocar 10 µl da suspensão entre a lâmina e lamínula, e fazer observação em aumento de 1000x. A visualização de uma ou mais espiroquetas com morfologia e movimentação características indica diagnóstico positivo. Assim o teste procura concentrar mais as partículas presentes na urina e tentando tornar mais fácil a visualização do micro-organismo.

8. BACTÉRIAS DE MAIOR FREQUÊNCIA NA ROTINA

8.1. *Staphylococcus spp*

Formam colônias redondas, com bordas irregulares e pigmentadas de coloração branca ou amarela, e, em sua maioria, são anaeróbios facultativos. Algumas amostras de *Staphylococcus aureus* podem produzir beta hemólise em Ágar sangue® (OLIVEIRA, 2000). São catalase-positivos e oxidase-negativos. No microscópio se apresentam como cocos Gram-positivos, com cerca de 1µm de diâmetro e tendem a formar agrupamentos semelhantes a cachos de uva. Podem ocorrer como comensais da pele e mucosas e como oportunistas, causando infecções piogênicas (QUINN et al., 2005).

8.2. *Streptococcus spp*

Apresentam-se como colônias pequenas, são cocos Gram-positivos, catalase negativos, oxidase negativos e anaeróbios facultativos. Têm cerca de 1µm de diâmetro e formam cadeias, como correntes, de diferentes comprimentos. São bactérias fastidiosas, portanto, requerem adição de sangue ou soro em seu meio de cultura, após 24 horas de incubação, podem apresentar hemólise. Podem causar infecções supurativas como mastite, metrite, poliartrite e meningite (QUINN et al., 2005).

8.3. *Escherichia coli*

São da mesma família das enterobactérias, a mesma família da salmonela, são bastonetes Gram negativos, catalase positivos, e oxidase negativos. Crescem no ágar MacConkey® e são fermentadoras de lactose adquirindo uma coloração rosa nesse meio devido à produção de ácido a partir da lactose. Em ágar EMB®. (Eosin Methylene Blue) produz colônia com brilho verde metálico, são indol e VM positivo, citrato negativo (QUINN et al, 2005). Podem ter efeito patogênico no intestino, provocando diarreia, porque algumas amostras produzem enterotoxinas (OLIVEIRA, 2000).

8.4. *Pseudomonas spp*

São bastonetes Gram negativos, catalase positivos, oxidase positivos, são oxidativos em açúcar, crescem em ágar MacConkey® e a *Pseudomonas aeruginosa* cresce em ágar Cetrimida®. Neste, adquire uma coloração esverdeada e possui um odor adocicado característico, lembrando uvas verdes. (OLIVEIRA, 2000)

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O período do estágio foi importante para lembrar e aprimorar diversos conhecimentos práticos e teóricos da microbiologia aprendidos durante a graduação. Conceitos de patogenia, patógenos oportunistas, patógenos obrigatórios, foram revistos, pois um simples micro-organismo, em ambiente favorável ao seu crescimento, pode sair de uma relação de mutualismo e começar a parasitar o indivíduo; ou o indivíduo pode entrar em contato por diversas maneiras com esses micro-organismos e seu sistema imune não consegue protegê-lo. Neste contexto, conceitos de biossegurança foram reaprendidos durante o estágio e serão sempre seguidos, para evitar a própria contaminação ou carreamento de patógenos para fora do laboratório.

Também foram adquiridos durante o estágio os chamados: "conhecimentos práticos de identificação bacteriana e fúngica", que foram utilizados diariamente. Bactérias foram identificadas por suas características coloniais, como forma, brilho, crescimento, bordos, odor produzido e coloração e também foram identificadas pelo seu metabolismo. Durante esse período também foi aprendido a "culinária" da produção de meios.

Outra questão muito importante foi o aprendizado de realização e leitura de antibiograma pois, atualmente, devido a uma utilização errônea dos antibióticos, muitas bactérias tem uma resistência à medicação, dificultando o tratamento e muitas vezes levando à morte dos animais. Na microbiologia, com o auxílio do antibiograma, podemos definir um tratamento mais eficiente para os pacientes, e com um custo-benefício melhor para o proprietário, que muitas vezes devido ao alto custo das medicações para o tratamento no antes do seu fim.

A participação nas atividades do laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da Universidade de Brasília possibilitou um aprofundamento teórico e prático estabelecendo a ligação entre a microbiologia e a clínica, permitindo melhores diagnósticos e tratamentos mais precisos.

10.REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFIA

1. BIOBRÁS DIAGNÓSTICOS. **Catálogo de Meios de Cultura. Biobrás SA.**
2. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Tecnologias em Serviços de Saúde: descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos.** Módulo 5, 2013. Disponível em: <<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/dvzH>>. Acesso em 10 de junho de 2015
3. Brod et al. **Evidencia do cão como reservatório da leptospirose humana: isolamento do sorovar, caracterização molecular e utilização em inquérito sorológico.** Revista da sociedade de medicina tropical 38(4):294-300, jun-ago, 2005
4. FILHO, GERMANO NUNES SILVA; DE OLIVEIRA, VETÚRIA LOPES. **Microbiologia Manual de Aulas Práticas.** Segunda edição. UFSC. Florianópolis, 2007.
5. KONEMAN, ELMER W; ALLEN, STEPHEN D; JANDA, WILLIAM M; SCHRECKENBERGER, PAUL C; WINN, WASHINGTON C, JR. **Diagnóstico Microbiológico Texto e Atlas colorido.** Quinta edição. Medsi, 2001.
6. MBIOLOG, 2015. Disponível em <http://www.mbiolog.com.br/?page_id=1440> Acesso em 16 de junho de 2015.
7. OIE, World Organisation for Animal Health. Diagnostic tests. Disponível em <<http://www.oie.int/our-scientific-expertise/veterinary-products/diagnostic-tests/>> Acesso em 16 de junho de 2015.
8. OLIVEIRA, SÉRGIO J. **Microbiologia Veterinária Guia Bacteriológico prático.** Segunda edição. ULBRA. Canoas, 2000.
9. OXOID.MANUAL OXOID. Primeira edição (português). 2000.
10. QUINN, P.J; CARTER, M.E; MARKEY, B; CARTER, G.R. **Clinical veterinary Microbiology.** WOLFE. Dublin, 1994.41
11. QUINN, P.J; MARKEY, B.K; CARTER, M.E; DONNELLY, W.J; LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infeciosas.** Editora ARTMED. Porto Alegre, 2005.