



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

FELIPE DE ALENCASTRO CALDAS PEREIRA

**ACOMPANHAMENTO DAS ATIVIDADES DO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA
MÉDICA VETERINÁRIA DA FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA
VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

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
Junho/2016



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

FELIPE DE ALENCASTRO CALDAS PEREIRA

**ACOMPANHAMENTO DAS ATIVIDADES DO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA
MÉDICA VETERINÁRIA DA FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA
VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

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

Orientadora
Profa Dra Simone Perecmanis

Brasília-DF
Junho/2016

FICHA CATALOGRÁFICA

PEREIRA, Felipe de Alencastro Caldas

Acompanhamento das atividades do Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília / Felipe de Alencastro Caldas Pereira, orientação de Simone Perecmanis – Brasília, 2016.

96p.

Relatório de estágio – Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2016.

1. Laboratório; 2. Microbiologia Médica Veterinária; 3. Doenças infecciosas; 4. Identificação; 5. Antibiograma

Cessão de Direitos

Nome do Autor: Felipe de Alencastro Caldas Pereira

Título do Relatório de Estágio para Conclusão de Curso: Acompanhamento das atividades do Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

Ano: 2016

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desse relatório 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 desse relatório pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do Autor: PEREIRA, Felipe de Alencastro Caldas

Título: Acompanhamento das atividades do Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

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

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Simone Perecmanis

Julgamento: _____

Instituição: Universidade de Brasília

Assinatura: _____

M.V Alice Martins da Silva

Julgamento: _____

Instituição: Universidade de Brasília

Assinatura: _____

M.V. João Paulo Barbosa

Julgamento: _____

Instituição: Universidade de Brasília

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, meus irmãos, minha namorada e a todos os meus familiares, pelo apoio incondicional ao longo desses anos, estando presentes em todos os momentos.

Aos meus colegas, por nos manterem motivados e por todos os momentos memoráveis pelos quais passamos durante a graduação.

Aos residentes Joao Paulo Barbosa , Alice Martins da Silva, Dalila Gonzaga, Yara Cavalcante e Gustavo Gomes Fonseca, das doenças infecciosas e parasitárias, ao professor de microbiologia Dr. Fabricio Campos, aos técnicos Cleia Nunes Malheiro de Oliveira e Maurício Macedo Rodrigues, da Micromédica, Dr. Bruno Dallago, do bem estar animal, Salvina, da parasitologia, e aos demais frequentadores da Micromédica, incluindo os estagiários e funcionários terceirizados, por tornarem esse período final um momento tão agradável.

Aos professores, mestres, doutores, palestrantes e, agora, colegas de profissão, que nos auxiliaram, testaram, instruíram e ensinaram não apenas uma vocação, mas também valores os quais levarei por toda vida.

À minha orientadora, Prof. Dra. Simone Peregmanis, por dividir seu vasto conhecimento, por toda a sua paciência, carinho, dedicação e prazer com os quais ela pratica sua profissão, sendo um exemplo, nos impulsionando a superar nossos próprios limites.

EPÍGRAFE

“Cada ser é um universo dentro de
outro universo.”

Felipe de A. C. Pereira

RESUMO

Este relatório tem a finalidade de apresentar as atividades realizadas no Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da Universidade de Brasília, durante o período de estágio supervisionado do estudante Felipe de Alencastro Caldas Pereira, no 1º período letivo de 2016, do dia 08 de março ao 10 de junho, resultando em 63 dias úteis, e completando, assim, 504 horas de estágio obrigatório supervisionado. Nele constam as principais atividades executadas pelo estudante no laboratório, como lavagem de vidrarias, produção de meios, reagentes e corantes e também toda a cadeia de atividades envolvidas na identificação dos microrganismos causadores de enfermidades. Além disso, ele apresenta informações sobre os principais meios de cultura, testes bioquímicos e procedimentos realizados na rotina laboratorial e dos diagnósticos produzidos pelo estudante e equipe do laboratório durante seu estágio.

ABSTRACT

This report aims to present the activities carried out in the Laboratory of Medic Veterinary Microbiology at the University of Brasilia, during the period of supervised internship of the student Felipe de Alencastro Caldas Pereira, in the first term of 2015, between March 8th and June 10th, resulting in 504 hours of obligatory supervised internship. It lists the main activities performed by the student at the laboratory, as the wash of glassworks, medias, reagents and dyes productions as well as the entire chain of activities involved in the identification of disease-causing microorganisms. Besides that, it presents information on the main culture media, biochemistry tests, procedures performed in the laboratory routine and the diagnoses produced by the student and laboratory staff during his internship.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - **Bancada de trabalho.**

Figura 2 - **Estufa de incubação microbiológica.**

Figura 3 - **Microscópios ópticos do laboratório.**

Figura 4 - **Capela de fluxo laminar.**

Figuras 5 - **Armário de meios.**

Figura 6 - **Bancada de preparação de meios.**

Figura 7 - **Estufa de secagem de vidrarias.**

Figura 8 - **Autoclaves.**

Figura 9 - **Destilador.**

Figura 10 - **Tanque de lavagem de vidrarias.**

Figura 11 - **Meio CLED® com desenvolvimento de colônias fermentadoras de lactose (amarelas) e de colônias não fermentadoras (azuis).**

Figura 12 - **Crescimento de *E. coli*, característica pela forte fermentação de lactose, criando uma cor esverdeada metálica, e de uma colônia não fermentadora em Ágar EMB®.**

Figura 13 - **Meio MacConkey® não inoculado (em cima) e inoculado (em baixo), apresentando coloração rosa pela fermentação da lactose.**

Figura 14 - **Meio MacConkey® com crescimento fúngico, ocasionando a alcalinização do meio, mudando sua cor para amarelo.**

Figura 15 - **Colônia fermentadora de lactose em Ágar SS® (esquerda) e cultura de**

***Samonella* spp com escurecimento do centro das colônias pela formação de H₂S.**

Figura 16 - Placa de **Ágar Sangue®** com crescimento de *Malassezia* spp

Figura 17 - **Ágar TSI®** H₂S positivo.

Figura 18 - **Ágar TSI®** com todos os açúcares fermentados e com formação de gás.

Figura 19 - **Caldo Enterococcosel®** com reação positiva, causando o escurecimento do meio (esquerda), e sem reação (negativo), sem alteração da cor original do caldo (direita).

Figura 20 - **Teste de esculina** positivo, com escurecimento do meio (esquerda), e negativo, sem alterações cromáticas (direita).

Figura 21 - **Teste da fenilalanina** positivo, apresentando reação de cor verde (esquerda), e negativo, sem apresentar reação alguma (direita).

Figura 22 - **Teste de fermentação de açúcares** positivo, causando a mudança de coloração do meio pela produção de ácidos advindos do processo fermentativo (esquerda), e negativo, sem a produção de ácidos e sem mudança de cor (direita).

Figura 23 - **Formação de crescimento em aspecto de nuvem**, significando resultado de motilidade positivo (esquerda), e ausência de motilidade (direita).

Figura 24 - **Testes de O/F fermentativos**, sendo um dos microrganismos anaeróbico obrigatório (esquerda), e outro anaeróbico facultativo (direita).

Figura 25 - **Figura 31: Teste de oxidase** positivo, com mudança de cor da fita de branco para púrpura (esquerda), e negativo, sem mudança de cor da fita (direita), sendo que a coloração rosa observada é original da própria colônia, pois, sendo uma fermentadora de lactose, foi coletada a partir do **Ágar MacConkey®**.

Figura 26 - **Meio Base Uréia®** positivo, apresentando coloração rosa (esquerda), e negativo (direita), sem alterações

Figura 27 - **Reação da redução de nitratos em diferentes intensidades, apresentando mudança da cor original do meio (esquerda e centro), e ausência de redução, sem alteração de cor (direita).**

Figura 28 - **Teste de VP® positivo, com cor avermelhada após de se ter adicionado as soluções e deixar reagir com o ar atmosférico por cerca de 15 minutos.**

Figura 29 - **Teste do citrato positivo, com coloração azulada (esquerda), e negativo, sem mudança de cor (direita).**

Figura 30 - **Teste do indol positivo, apresentando um halo de cor rosa.**

Figura 31 - **Teste do VM® intermediário, apresentando coloração alaranjada após derramar-se o reagente.**

Figura 32 - **Visualização de bastonetes gram negativos, corados pelo método de coloração de gram, por meio de microscópio óptico.**

Figura 33 - **Visualização de estruturas leveduriformes, coradas com coloração de gram, com presença de pseudohifas.**

Figura 34 - **Visualização de *Mycobacterium* spp corada com o método Ziehl-Neelsen.**

Figura 35 - **Visualização de microscopia óptica em televisão de *Penicillium* spp com o corante azul de metileno.**

Figura 36 - **Visualização de *Dermatophilus congolensis* em microscopia óptica com azul de metileno.**

Figura 37 - **Esquema de esgotamento do inóculo para isolamento. Na figura está indicado a ordem de estrias feitas com a alça e seu aspecto após a incubação.**

Fonte Pires, R. F L. C. **ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA MÉDICA VETERINÁRIO DA FAV – UnB.** Brasília, 2013.

Figura 38 - **Antibiograma em placa de Muller Hinton®**, evidenciando-se os halos de inibição. Fonte: FONSECA, I. C. F.; **Relato de atividades realizadas no laboratório de microbiologia veterinária do hospital veterinário – UnB**. Brasília, 2015.

Figura 39 - **Antibiograma em placa de Muller Hinton Sangue®**, para testar a resistência a antimicrobianos de microrganismos exigentes. Fonte: FONSECA, I. C. F.; **Relato de atividades realizadas no laboratório de microbiologia veterinária do hospital veterinário – UnB**. Brasília, 2015.

Figura 40 - **Chave de identificação adaptada**. Fonte: QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. **Clinical Veterinary Microbiology**. Dublin: Wolfe, 1994, 648p.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Levantamento das amostras bacteriológicas recebidas de março a junho de 2016.

Gráfico 2 - Levantamento dos locais de onde foram coletadas as amostras bacteriológicas recebidas de março a junho de 2016.

Gráfico 3 - Levantamento das espécies das quais foram coletadas as amostras bacteriológicas de março a junho de 2016.

Gráfico 4 - Resultados dos exames bacteriológicos de março a junho de 2016.

Gráfico 5 - Levantamento das amostras micológicas recebidas de março a junho de 2016.

Gráfico 6 - Levantamento dos locais de onde foram coletadas as amostras micológicas recebidas de março a junho de 2016.

Gráfico 7 - Levantamento das espécies das quais foram coletadas as amostras micológicas de março a junho de 2016.

Gráfico 8 - Resultados dos exames micológicos de março a junho de 2016.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - **EPIs, risco evitado e características de proteção.** Fonte - World Health Organization ,2004.

Tabela 2 - **Requisitos para os diversos níveis de segurança biológica.** Fonte - World Health Organization, 2004.

Tabela 3 - **Tabela de diferenciação das espécies de importância veterinária do gênero *Staphylococcus*.**

Tabela 4 - **Características dos diagnósticos bacteriológicos feitos no Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária do período de março a junho de 2016.**

Tabela 5 - **Características dos diagnósticos micológicos feitos no Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária do período de março a junho de 2016.**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. BIOSSEGURANÇA	3
3. ESTRUTURA DO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA MÉDICA VETERINÁRIA DA FAV- UnB	8
3.1 LABORATÓRIO OU SETOR DE BACTERIOLOGIA E MICOLOGIA	8
3.2 SALA DE MEIOS E VIROLOGIA OU SETOR DE PREPARO DE MEIOS E SOLUÇÕES E DE VIROLOGIA	11
3.3 SALA DE DESCARTE DE RESÍDUOS OU SETOR DE DESCARTE DE RESÍDUOS E ESTERILIZAÇÃO DE MATERIAIS	12
4. MEIOS DE CULTURA	13
4.1 MEIOS SÓLIDOS	14
4.1.1 ÁGAR BASE TRYPTOSE®	14
4.1.2 ÁGAR CETRIMIDA®	14
4.1.3 ÁGAR CLED®	14
4.1.4 ÁGAR EMB®	15
4.1.5 ÁGAR MACCONKEY®	16
4.1.6 ÁGAR MUELLER-HINTON®	17
4.1.7 ÁGAR MYCOSEL®	18
4.1.8 ÁGAR NUTRIENTE®	18
4.1.9 ÁGAR SABOURAUD®	18
4.1.10 ÁGAR SALMONELLA SHIGELLA® (ÁGAR SS®)	19
4.1.11 ÁGAR SANGUE®	19
4.1.12 MEIO DE LOWENSTEIN-JENSEN®	20
4.2 MEIOS SEMI-SÓLIDOS	20
4.2.1 CALDO TIOGLECONATO®	21
4.3 MEIOS LÍQUIDOS	21
4.3.1 CALDO BHI®	21
4.3.2 CALDO MUELLER HINTON®	22
5. TESTES BIOQUÍMICOS	22
5.1 ÁGAR SIM®	22
5.2 ÁGAR TRIPLE SUGAR IRON® (ÁGAR TSI®)	23
5.3 CALDO ENTEROCOCCOSEL®	24
5.4 TESTE DA CATALASE	25
5.5 TESTE DA COAGULASE LIGADA OU FATOR DE AGLUTINAÇÃO OU “CLUMPING FACTOR”	26
5.6 TESTE DA COAGULASE LIVRE OU COAGULASE EM TUBO	26
5.7 TESTE DA DESCARBOXILASE E DIIDROLASE	26

5.8	TESTE DA ESCULINA	27
5.9	TESTE DA FENILANINA	28
5.10	TESTE DA FERMENTAÇÃO DE AÇÚCARES	29
5.11	TESTE DA GELATINASE	30
5.12	TESTE DA MOTILIDADE	31
5.13	TESTE DA OXIDAÇÃO E FERMENTAÇÃO	31
5.14	TESTE DA OXIDASE	33
5.15	TESTE DA UREASE	34
5.16	TESTE DE REDUÇÃO DE NITRATOS	35
5.17	TESTE DE VOGES PROSKAUER® (VP) OU TESTE DA PRODUÇÃO DE ACETOÍNA	36
5.18	TESTE DO CITRATO	37
5.19	TESTE DO HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO (KOH)	38
5.20	TESTE DO INDOL	39
5.21	TESTE DO MALONATO	40
5.22	TESTE DO VERMELHO DE METILA® (VM)	40
6.	EXAME CITOLÓGICO	41
6.1	MÉTODO DE COLORAÇÃO DE GRAM	42
6.2	MÉTODO DE COLORAÇÃO ZIEHL-NEELSEN	43
6.3	AZUL DE METILENO E MÉTODO DA FITA ADESIVA	45
6.4	MICROSCOPIA DE CAMPO ESCURO	46
7.	ISOLAMENTO E REPIQUE DE AMOSTRAS	47
8.	TESTE DA DIFUSÃO EM DISCO (ANTIBIOGRAMA)	48
9.	ROTINA LABORATORIAL	50
9.1	INOCULAÇÃO E INCUBAÇÃO DE AMOSTRAS BACTERIANAS	51
9.2	IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS	53
9.2.1	DIFERENCIAÇÃO DE <i>STAPHYLOCOCCUS</i> SPP	55
9.3	INOCULAÇÃO E INCUBAÇÃO DE AMOSTRAS FÚNGICAS E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS	58
9.4	ROTINA DE PREPARO DE MEIOS E SOLUÇÕES	59
9.5	ROTINA DE DESCARTE DE RESÍDUOS E LAVAGEM DO LABORATÓRIO	60
10.	CASUÍSTICA	61
10.1	Levantamento de casos bacteriológicos	61
10.1.1	DESCRIÇÃO DOS DIAGNÓSTICOS BACTERIOLÓGICOS MAIS FREQUENTES	65
10.2	LEVANTAMENTO DE CASOS MICOLÓGICOS	66
10.2.1	DESCRIÇÃO DOS DIAGNÓSTICOS MICOLÓGICOS MAIS FREQUENTES	70
11.	EMISSÃO DE LAUDOS	72
12.	RELATO DE EXPERIÊNCIA	72

13. CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
14. REFERÊNCIAS	75

1. INTRODUÇÃO

Durante os três séculos decorridos desde que Leeuwenhoek observou, pela primeira vez, bactérias e protozoários com seu microscópio primitivo, acumularam-se inúmeros conhecimentos sobre os pequenos “animáculos”, agora conjuntamente conhecidos como microrganismos (KONEMAN et al., 2001).

A partir desse ponto, a microbiologia tem sofrido enorme mudança, desde as pioneiras investigações de Pasteur e Koch, que há mais de 120 anos elucidaram a natureza das doenças infecciosas, até hoje. Essa disciplina, que agora ocupa uma posição central no currículo da medicina veterinária, tem-se desenvolvido dentro de uma ampla complexidade, que varia desde a caracterização cultural e bioquímica dos microrganismos patogênicos até técnicas moleculares avançadas usadas para identificar genes associados a fatores de virulência (QUINN et. al, 2005).

Os microrganismos, que são encontrados em todos os ambientes incluindo solo, água e ar, participam de todas as funções vitais observadas em formas de vida superiores, mais complexas, incluindo plantas, animais e o homem (KONEMAN et al. 2001). O número relativamente pequeno de microrganismos que podem causar doenças em animais e humanos são referidos como patogênicos (QUINN et al., 2005).

Para identificar tais agentes etiológicos, a investigação laboratorial, associada ao contexto da amostra e acompanhada de uma suspeita clínica, são necessários, além de, algumas vezes, determinar a sensibilidade dos patógenos aos antimicrobianos, esclarecendo o grau de patogenicidade de determinado organismo e auxiliando no tratamento mais eficaz para determinada doença (QUINN et al., 2005).

Assim, um diagnóstico microbiológico com rapidez e precisão é necessário, visto que as enfermidades infecciosas dos animais, em particular as de natureza epizootica, estão adquirindo uma importância cada vez maior para a saúde pública global. Sua importância é ressaltada, sendo que algumas enfermidades infecciosas emergentes podem ultrapassar rapidamente a esfera local e, pois, necessitam de agilidade e acurácia no diagnóstico (OIE, 2015).

Baseado em tais conhecimentos, durante o período de estágio no Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da UnB, foi possível estudar e discutir diversos casos relativos às doenças infecciosas, desde a coleta dos materiais, até o diagnóstico laboratorial e a produção de antibiogramas. Dessa forma, o conhecimento sobre os diversos microrganismos e os tratamentos das diferentes doenças infecciosas, foram aprofundados.

2. BIOSSEGURANÇA

O conceito de biossegurança começou a ser realmente construído no início da década de 1970, logo após o surgimento da engenharia genética.

Biossegurança é o conjunto de ações voltadas para a prevenção, minimização ou eliminação dos riscos inerentes às atividades de pesquisa, produção, ensino, desenvolvimento tecnológico e prestação de serviços. Estes riscos podem comprometer a saúde do homem e animais, o meio ambiente ou a qualidade dos trabalhos desenvolvidos (Teixeira; Valle, 1996). Há ainda outros conceitos para a biossegurança, como o que está relacionado à prevenção de acidentes em ambientes ocupacionais, incluindo o conjunto de medidas técnicas, administrativas, educacionais, médicas e psicológicas (Costa, 1996).

A biossegurança envolve a análise dos riscos a que os profissionais de saúde e de laboratórios estão constantemente expostos em suas atividades e ambientes de trabalho. A avaliação de tais riscos engloba vários aspectos, sejam relacionados aos procedimentos adotados, as chamadas boas práticas em laboratório (BPLs), aos agentes biológicos manipulados, à infraestrutura dos laboratórios ou informacionais, como a qualificação das equipes (Brasil, 2006). A biossegurança tem várias normas a fim de diminuir a exposição de trabalhadores a riscos e a prevenção de contaminação ambiental (Hambleton et al., 1992). Os guias de biossegurança são uma combinação de controle de engenharia, políticas de gerenciamento, práticas e procedimentos de trabalho, tanto quanto intervenções médicas (Coico; Lunn, 2005).

Os agentes biológicos foram classificados em classes de 1 a 4, incluindo também a classe de risco especial, segundo sua virulência, estabilidade do agente, modo de transmissão, origem do material potencialmente infeccioso, sua concentração e volume, disponibilidade de tratamento eficaz, disponibilidade de medidas profiláticas eficazes, dose infectante, tipo de ensaio e fatores referentes ao trabalhador (Brasil, 2006).

Classe de risco 1

Agentes biológicos que oferecem baixo risco individual e para a coletividade, descritos na literatura como não patogênicos para as pessoas ou animais adultos saudáveis. Exemplos: *Lactobacillus* sp., *Bacillus* sp (Brasil, 2006).

Classe de risco 2

Agentes biológicos que oferecem moderado risco individual e limitado risco para a comunidade, que provocam infecções no homem ou nos animais, cujo potencial de propagação na comunidade e de disseminação no meio ambiente seja limitado, e para os quais existem medidas terapêuticas e profiláticas eficazes. Exemplos: *Mycoplasma* sp, *Shigella* sp, *Salmonella* sp, *Staphylococcus* sp, *Aspergillus* sp, *Candida* sp (Brasil, 2006).

Classe de risco 3

Agentes biológicos que oferecem alto risco individual e moderado risco para a comunidade, que possuem capacidade de transmissão por via respiratória e que causam patologias humanas ou animais, potencialmente letais, para as quais existem usualmente medidas de tratamento e/ou de prevenção. Representam risco se disseminados na comunidade e no meio ambiente, podendo se propagar de pessoa a pessoa. Exemplos: *Brucella* sp, *Bacillus anthracis*, *Pasteurella multocida*, *Mycobacterium* sp, *Francisella tularensis*, *Coccidioides immitis*, culturas fúngicas esporuladas, *Histoplasma capsulatum* (Brasil, 2006).

Classe de risco 4

Agentes biológicos que oferecem alto risco individual e para a comunidade, com grande poder de transmissibilidade por via respiratória ou de transmissão desconhecida. Nem sempre está disponível um tratamento eficaz ou medidas de prevenção contra esses agentes. Causam doenças humanas e animais de alta gravidade, com alta capacidade de disseminação na comunidade e no meio ambiente. Esta classe inclui principalmente os vírus. Exemplos: *Cowdria ruminantium*

Classe de risco especial

Agentes biológicos que oferecem alto risco de causar doença animal grave e de disseminação no meio ambiente de doença animal não existente no país e que, embora não sejam obrigatoriamente patógenos de importância para o homem, podem gerar graves perdas econômicas e/ou na produção de alimentos (Brasil, 2006).

Além das técnicas microbiológicas de segurança, as barreiras primárias (equipamentos de segurança e equipamentos de proteção individual e coletiva) e barreiras secundárias (facilidades de salvaguardas) são agora consideradas como elementos vitais de medidas de contenção (Kimman et al., 2008).

Os equipamentos de proteção individual, conhecidos como EPIs (Tabela 1), têm a função de minimizar a exposição aos riscos ocupacionais e evitar possíveis acidentes laboratoriais. Os equipamentos de proteção coletiva (EPCs) são utilizados a fim de de minimizar a exposição dos trabalhadores aos riscos e, em casos de acidentes, reduzir suas consequências. Exemplos: lava-olhos, chuveiro, extintor e cabines de proteção biológica (Teixeira; Valle, 1996).

As barreiras secundárias dizem respeito à construção do laboratório, localização e instalações físicas. As instalações físicas são capazes de proporcionar uma barreira de proteção para pessoas dentro e principalmente fora do laboratório, bem como para o meio ambiente. Os tipos de barreiras secundárias dependerão do risco de transmissão dos agentes específicos manipulados no laboratório. São alguns exemplos de barreiras secundárias: a localização distante do acesso público, a presença de sistemas de ventilação especializados em assegurar o fluxo de ar unidirecionado, sistemas de tratamento de ar para a descontaminação ou remoção do ar liberado e câmaras pressurizadas como entradas de laboratório (Brasil, 2006).

Tabela 1 - EPIs, risco evitado e características de proteção.

Equipamento	Risco evitado	Características de proteção
Jalecos e aventais de pano	Contaminação do vestuário	Cobrem o vestuário pessoal
Aventais plásticos	Contaminação do vestuário	Impermeáveis
Calçado	Impactos e salpicos	Fechados à frente
Óculos de proteção	Impactos e salpicos	Lentes resistentes a impactos Proteções laterais
Óculos de segurança	Impactos	Lentes resistentes a impacto Proteções laterais
Viseira de proteção facial	Impactos e salpicos	Proteção total da face Fácil de tirar em caso de acidente
Aparelhos e máscaras de respiração	Inalação de aerossóis	Há diversos modelos: descartável, completa ou meia máscara purificadora de ar, de capuz com ar filtrado à pressão e com abastecimento de ar
Luvas	Contato direto com micro-organismos e cortes	Em látex, vinilo ou nitrilo microbiologicamente aprovados, descartáveis Malha de aço

Fonte: World Health Organization, 2004.

Os laboratórios são divididos respeitando os níveis de biossegurança (NB) em que

se enquadram, denominados NB-1, NB-2, NB-3 e NB-4. Tais níveis estão relacionados aos requisitos crescentes de segurança para o manuseio dos agentes biológicos, terminando no maior grau de contenção e de complexidade do nível de proteção. O NB exigido para um ensaio será determinado pelo agente biológico de maior classe de risco envolvido no ensaio.

As classificações são as seguintes (Brasil, 2006):

Nível de Biossegurança 1 (NB-1)

É o nível necessário ao trabalho que envolva agentes biológicos da classe de risco 1. Representa um nível básico de contenção, que se fundamenta na aplicação das BPLs, na utilização de equipamentos de proteção e na adequação das instalações. O trabalho é conduzido, em geral, em bancada.

Nível de Biossegurança 2 (NB-2)

É o nível exigido para o trabalho com agentes biológicos da classe de risco 2. O acesso ao laboratório deve ser restrito a profissionais da área, mediante autorização do profissional responsável.

Nível de Biossegurança 3 (NB-3)

Este nível é aplicável aos locais onde forem desenvolvidos trabalhos com agentes biológicos da classe de risco 3.

Nível de Biossegurança 4 (NB-4)

Este nível é necessário a trabalhos que envolvam agentes biológicos da classe de risco 4 e agentes biológicos especiais. Nesse tipo de laboratório o acesso dos profissionais deve ser controlado por sistema de segurança rigoroso. Na Tabela 4 observa-se um resumo dos requisitos básicos exigidos em cada nível de biossegurança laboratorial, incluindo estrutura, equipamentos e práticas.

Tabela 2 - Requisitos para os diversos níveis de segurança biológica.

Atributo	Níveis de segurança biológica			
	1	2	3	4
Isolamento do laboratório	N	N	S	S
Sala selada para descontaminação	N	N	S	S
Ventilação:				
- Adução do ar	N	D	S	S
- Sistema de ventilação controlada	N	D	S	S
- Exaustor com filtro HEPA	N	N	S	S
Entrada com porta dupla	N	N	S	S
Sistema de portas com tranca	N	S	S	S
Câmara de vácuo	N	N	S	S
Câmara de vácuo com ducha	N	N	N	S
Antecâmara	N	N	S	-
Antecâmara com ducha	N	N	S	N
Tratamento dos efluentes	N	N	S	S
Autoclave:				
- in loco	N	D	S	S
- numa sala do laboratório	N	N	D	S
- de duas portas	N	N	D	S
Câmaras de segurança biológica				
- classe I	D	D	N	N
- classe II	N	D	S	S
- classe III	N	N	D	S
Circuito interno de imagem	N	N	D	S
Registro em autoridades sanitárias nacionais	N	N	S	S
Roupas de proteção com pressão positiva e ventilação	N	N	N	S
Uso EPI's	S	S	S	S
Realização das BPL's	S	S	S	S
Incineração dos resíduos após esterilização	N	N	N	S

N - Abstenção de necessidade; S - Uso obrigatório; D - Uso desejável. **Fonte: World Health Organization (2004).**

O Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da Unb, pode ser classificado como laboratório de nível de biossegurança 2, devido ao uso de EPI's e BPL's, À presença de câmara de segurança biológica classe II (capela de fluxo laminar), de autoclave e de sistema de portas com tranca.

3. ESTRUTURA DO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA MÉDICA VETERINÁRIA DA FAV- UnB

O laboratório fica localizado no Hospital Veterinário de Pequenos Animais, na L4 norte, pertencendo ao campus Darcy Ribeiro da UnB, e seu funcionamento é de segunda a sexta-feira no horário de 8:00h às 18:00h. A professora doutora Simone Perecmanis é a responsável pelo laboratório, e também orienta estudantes de pós graduação, mestrado, doutorado, residentes, bolsistas, técnicos, estagiários.

O laboratório possui, além dos estagiários interinos, uma equipe de dois técnicos: Cleia Nunes Malheiro de Oliveira e Maurício Macedo Rodrigues; e dois residentes: Alice Martins da Silva e João Paulo Barbosa.

Assim, ele possui três setores: o setor de bacteriologia e micologia (laboratório); o setor de preparo de meios e soluções; e o setor de lavagem e esterilização de materiais.

3.1 LABORATÓRIO OU SETOR DE BACTERIOLOGIA E MICOLOGIA

O Setor de bacteriologia e micologia é o local onde são recebidas e armazenadas as amostras bacteriológicas, fúngicas e citológicas, sendo feitas as análises desses materiais, tanto para a rotina quanto para experimentos. É nesse setor onde os meios são distribuídos e as amostras são cultivadas, isoladas, identificadas e testadas para determinar a sensibilidade aos antibióticos.

Ele contém duas bancadas para a manipulação de amostras recebidas, sendo que cada uma possui um bico de Bunsen a fim de fazer a esterilização por meio do calor das alças e agulhas bacteriológicas, além de ser utilizada para a fixação de bactérias em lâminas histológicas, proporcionando um fluxo que protege o usuário ao manusear as amostras.



Figura 1: Bancada de trabalho. Fonte: Acervo pessoal.

Também comporta duas estufas para a incubação e crescimento em ambiente e temperatura favoráveis de 37C⁰ de vários microrganismos, além de acomodar três geladeiras, sendo uma para o armazenamento de reagentes e meios sólidos, semi sólidos e líquidos; outra para armazenar vidros com discos de antibióticos dentre outros objetos não contaminados, como materiais utilizados em experimentos de mestrado e projetos de alunos de graduação; e a última para guardar meios de cultura e semi cultura (teste de gelatina) inoculados, amostras recebidas e outros materiais contaminados que ainda não foram identificadas e ainda estão sendo utilizadas para concluir laudos ou estão sendo guardadas a fim de realizar experimentos ou de serem utilizados em aulas práticas.



Figura 2: Estufas de incubação microbiológica. Fonte: Acervo pessoal.

Possui um vórtex e três microscópios, dos quais dois são para a visualização de lâminas e classificação de Gram, e um para microscopia de campo escuro, utilizado para a visualização de amostras de urina com suspeita para *Leptospira* spp.



Figura 3: Microscópios ópticos do laboratório. Fonte: Acervo pessoal.

Tem um computador e uma impressora, que são utilizados para pesquisas, digitação, envio e impressão de laudos, consulta de POPs e fins administrativos.

Engloba os insumos utilizados na rotina como álcool 70%, reagentes e corantes para coloração de gram, azul de metileno e testes bioquímicos, assim como lâminas histológicas, placas de petri, pipetas, pipetadores, pêras, máscaras, tocas, luvas, swabs, tubos tipo falcon, eppendorfs, dentre outros.

Além disso, abriga uma capela de fluxo laminar com a função de criar uma área de trabalho segura, impedindo o trânsito de aerossóis contaminantes, para a distribuição de meios advindos da autoclave, para a manipulação de amostras potencialmente perigosas, como suspeitas de leptospirose, e para a realização de diversos experimentos que exigem um ambiente estéril sem contaminação do meio externo.



Figura 4: Capela de fluxo laminar. Fonte: Acervo pessoal.

3.2 SALA DE MEIOS E VIROLOGIA OU SETOR DE PREPARO DE MEIOS E SOLUÇÕES E DE VIROLOGIA

Nesse setor as bases, os substratos e os materiais dos meios são armazenados, quantificados e diluídos, ou seja, é onde os meios de cultura, semi cultura e as soluções são preparadas.

Esse setor enquadra um armário para papelaria e instrumentos de limpeza como esponjas e detergentes; um de armazenamento, onde são guardadas todas as bases para a preparação dos meios; balança de precisão, bailarina, aparelho de micro-ondas, estufa para a secagem da vidraria, banho-maria, pHmetro, reservatório para água destilada e pia; além disso há diversos materiais para o preparo e proteção de meios e soluções como béqueres, erlenmeyers, pipetas, provetas, imãs, bastões de vidro, elásticos, papelões, papel alumínio dentre outros. Também é nesse setor onde são armazenados todos os tubos de vidro e tampas que serão utilizadas para os testes bioquímicos.



Figura 5: Armário de meios Acervo pessoal.



Figura 6: Bancada de preparo de Fonte: meios. Fonte: Acervo pessoal.



Figura 7: Estufa de secagem de vidrarias. Fonte: Acervo pessoal.

3.3 SALA DE DESCARTE DE RESÍDUOS OU SETOR DE DESCARTE DE RESÍDUOS E ESTERILIZAÇÃO DE MATERIAIS

Nesse setor, lavam-se e autoclavam-se as vidrarias, como placas de petri e tubos de ensaio, a fim de serem reutilizadas. Os outros materiais biologicamente perigosos usados no laboratório, que serão descartados, são apenas autoclavados.

A sala de descarte de resíduos engloba três autoclaves, sendo uma automática e as outras duas manuais; uma estufa mantida a 30 °C para incubação de microrganismos específicos, como *Mycobacterium* spp; duas pias para lavagem de tampas e vidraria; destilador e reservatórios para água destilada; e recipientes para auxiliar na limpeza da vidraria, além de materiais de limpeza como esponjas, detergentes, escovas, dentre outros.



Figura 8: Autoclaves
Fonte: Acervo pessoal.



Figura 9: Destilador
Fonte: Acervo pessoal.



Figura 10: Tanque de lavagem de vidrarias. Fonte: Acervo pessoal.

4. MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura têm como objetivo proporcionar um ambiente nutritivo para estimular o crescimento microbiano.

Os meios de cultura mais utilizados na rotina do laboratório são o ágar Sangue®, ágar MacConkey®, ágar Cetrimidas®, ágar Cled®, ágar EMB®, ágar Sabouraud®, ágar e caldo Mueller-Hinton®, caldo tioglicolato® e caldo BHI®

4.1 MEIOS SÓLIDOS

Os meios sólidos geralmente possuem altas concentrações de Ágar® em sua composição e são em sua maioria meios de plaqueamento, para a cultura de microrganismos, podendo ser também meios de semi cultura, como o meio Ágar Base Uréia® e o Ágar Citrato®.

4.1.1 ÁGAR BASE TRYPTOSE®

Meio de cultura altamente nutritivo, permitindo o crescimento excelente de muitos organismos exigentes. Após a autoclavagem do meio, e de deixá-lo resfriar por volta de 50 C, a fim de obter o Ágar Base Sangue Triptose®, pode-se adicionar 7% de sangue estéril, sendo ele bastante nutritivo e recomendado para colônias fastidiosas, além possibilitar a observação das hemólises. Entretanto, para otimizar o crescimento de certos microrganismos, como *Neisseria meningitidis* e *Streptococcus pneumoniae*, pode-se adicionar extrato de levedura ao meio (OXOID, 2000).

4.1.2 ÁGAR CETRIMIDA®

O ágar cetrimida, ou ágar base pseudomonas, apesar de ser um meio seletivo para *Pseudomonas spp.*, principalmente para a *Pseudomonas aeruginosa*, pode propiciar o crescimento de alguns membros da família *Enterobacteriaceae* como *Klebsiella*, *Providencia*, *Proteus spp*, por exemplo (OXOID, 2000).

Nesse meio, quando há o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, a produção dos pigmentos piocianina, que resulta em uma cor verde azulada característico dessas colônias, e fluoresceína, que é fluorescente quando irradiado pela luz negra é favorecida (BIOBRÁS, 2013).

Assim, podemos interpretar a presença da pigmentação verde azulada, associada ou não ao odor doce de uvas, como evidências presuntivas de *Pseudomonas aeruginosa* ou *Pseudomonas spp*, sendo necessários testes posteriores para identificar o microrganismo.

4.1.3 ÁGAR CLED®

Meio usado para isolamento e quantificação de microrganismos presentes em

amostras de urina, havendo crescimento de bactérias gram positivas, gram negativas e de leveduras. O ágar CLED®, devido à sua deficiência de eletrólitos, inibe o espalhamento de cepas de *Proteus* (ANVISA, 2004).

Os organismos fermentadores de lactose produzem colônias de coloração amarela e amarelamento do próprio meio, enquanto que as colônias não fermentadoras são translúcidas e não causam alterações na coloração do meio, que é azul. Embora seja um meio o qual há o crescimento de todos os microrganismos patogênicos presentes na urina, algumas espécies de *Shigella* podem apresentar ausência de crescimento (OXOID, 2000).

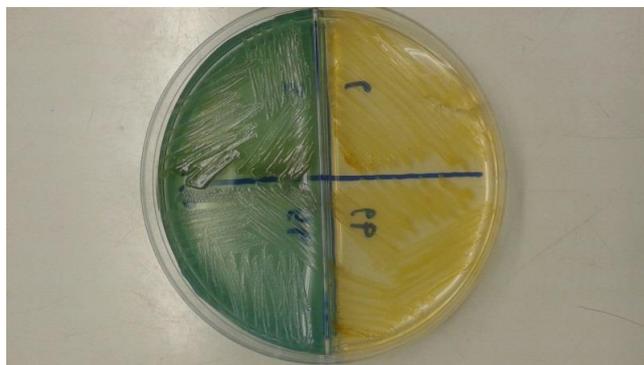


Figura 11: Meio CLED® com desenvolvimento de colônias fermentadoras de lactose (amarelas) e de colônias não fermentadoras (azuis). Fonte: Acervo pessoal.

4.1.4 ÁGAR EMB®

É um meio de plaqueamento diferencial para isolamento e detecção de Enterobacteriaceae ou bastonetes coliformes relacionados a partir de amostras com bactérias mistas. Sendo assim, inibem as bactérias gram positivas e gram negativas exigentes por possuir os corantes de anilina, sendo eles a eosina e o azul de metileno, que também servem como indicadores de fermentação de lactose, pois se combinam em pH ácido formando um precipitado (KONEMAN, et al. 2001).

Esse meio é bastante versátil, podendo ser usado para diferenciação de *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* e até *Candida albicans* e estafilococos coagulase positivo (OXOID, 2000).

As colônias isoladas de *E. coli* possuem de 2mm a 3mm de diâmetro, mostrando, em sua maioria, um brilho verde metálico pela luz refletida, devido ao fato de serem fermentadoras intensas de lactose. As colônias de *E. aerogenes* têm cerca de 5mm de

diâmetro, com os centros marrom acinzentados e normalmente não apresentam brilho metálico. Por sua vez, as bactérias que são fermentadores de lactose fracos, apresentam colônias cor púrpura, enquanto as não fermentadoras são incolores. Já a *C. Albicans*, em dióxido de carbono 10%, formam colônias em forma de aranhas ou penas, porém, outras espécies de *Candida* produzem colônias lisas semelhantes à de leveduras, podendo ter uma aparência variável (OXOID, 2000).

E embora esse seja um meio seletivo para gram negativas, estafilococos coagulase positivos podem ter um crescimento de colônias minúsculas e incolores (Menolasino et al., 1960).



Figura 12: Crescimento de *E. coli*, característica pela forte fermentação de lactose, criando uma cor esverdeada metálica, e de uma colônia não fermentadora em Ágar EMB®. Fonte: Acervo pessoal.

4.1.5 ÁGAR MACCONKEY®

Devido à presença de sais biliares, e principalmente a do cristal violeta, o ágar MacConkey é um meio seletivo útil para isolar enterobactérias e outras bactérias gram-negativas. Também. Por causa da presença do vermelho de fenol, que tem a função de indicador de pH, permite diferenciar as colônias entre fermentadoras de lactose, apresentando coloração rosa devido à diminuição do pH pela formação de ácido como produto final da fermentação. As não fermentadoras, que utilizam as peptonas como fonte de nitrogênio, resultam em produtos metabólicos alcalinos e, portanto, incolores (QUINN, et al., 2005), podendo causar uma mudança na coloração do meio de rosa para amarelo.



Figura 13: Meio MacConkey® não inoculado (em cima) e inoculado (em baixo), apresentando coloração rosa pela fermentação da lactose. Fonte: Acervo pessoal.

Também pode haver crescimento de determinadas bactérias gram-positivas como alguns estafilococos e enterococos fecais (OXOID, 2000), assim como também é possível o crescimento de alguns fungos.



Figura 14: Meio MacConkey® com crescimento fúngico, ocasionando a alcalinização do meio, mudando sua cor para amarelo. Fonte: Acervo Pessoal.

4.1.6 ÁGAR MUELLER-HINTON®

O meio Mueller-Hinton é não seletivo, sendo há décadas utilizado para teste de sensibilidade de antibióticos. Por ser um meio nutritivo, é considerado propício para o crescimento da maioria dos microrganismos (BIOBRÁS).

A inclusão de amido garante que fatores tóxicos formados durante o crescimento sejam absorvidos e é essencial para o crescimento de inóculos muito pequenos (Olsen e Scott, 1946)

É o meio internacionalmente eleito para testar a sensibilidade de antibióticos por difusão em disco, sendo que os diâmetros das zonas de inibição são medidos (mm) e comparados com medidas internacionalmente aceitas para determinar a sensibilidade ou

resistência do isolado (QUINN et al., 1994).

No entanto, a incubação em atmosfera enriquecida com CO₂, devido ao seu efeito no pH do meio, não é recomendada (OXOID, 2000).

Pode-se, para microrganismos mais exigentes, após o meio ter sido autoclavado e resfriado a 50 °C, adicionar 7% de sangue ovino estéril na capela de fluxo laminar, obtendo o Ágar Mueller Hinton Sangue®.

4.1.7 ÁGAR MYCOSEL®

O Ágar Mycosel® é um meio altamente seletivo, contendo ciclohexamida e cloranfenicol. É recomendado para o crescimento de fungos patogênicos de materiais contendo uma grande quantidade de flora e outros fungos e bactérias (DIFCO e BBL, 2009)

É o ágar de eleição para cultivo de fungos dermatófitos no Laboratório de Microbiologia Médica do Hospital Veterinário da UnB, por ter antimicrobianos em sua composição e por apresentar um pH mais alcalino que o Ágar Sabouraud®.

4.1.8 ÁGAR NUTRIENTE®

É um meio não seletivo, relativamente simples, de fácil preparação e barato, sendo muito usado nos procedimentos de rotina em laboratórios de microbiologia (ANVISA, 2004).

Pode-se adicionar até 10% do sangue, para um meio mais rico em nutrientes, obtendo-se, pois, o Ágar Sangue® (OXOID, 2000).

O Ágar Nutriente® é um meio apropriado para ensino e demonstração (OXOID, 2000).

4.1.9 ÁGAR SABOURAUD®

Este é um ágar que possui um pH ácido para isolamento de dermatófitos, leveduras e outros fungos, sendo adequado para o cultivo e diferenciação deles (OXOID, 2000). Isso porque, nesse meio, os fungos mantêm sua aparência típica e podem, pois, ser identificados de acordo com as suas características macroscópicas descritas por Sabouraud (SABOURAUD, 1910).

Também pode ser adicionado ao meio, para teste de dermatófitos, o antibiótico

ciclo-heximida e o indicador de pH vermelho de fenol. Devido à produção de metabólitos alcalinos pelos fungos dermatófitos, o meio, inicialmente ácido, que apresenta a cor amarela se torna vermelho em 7 - 14 dias (HABIF, 2012)

4.1.10 ÁGAR SALMONELLA SHIGELLA® (ÁGAR SS®)

O Ágar SS® é um meio seletivo diferencial para o isolamento de *Salmonella* e de algumas espécies de *Shigella* de amostras clínicas. Os microrganismos gram positivos e coliformes são inibidos pela ação de componentes seletivos inibitórios como o verde brilhante, os sais biliares, o tiosulfato e o citrato. O tiosulfato, além de ter função de selecionar e inibir certos organismos, também age como indicador da produção de sulfeto ao reagir com o ferro, resultando no escurecimento do centro das colônias (OXOID, 2000).

Colônias que não fermentam lactose são incolores, enquanto que as fermentadoras desse açúcar se tornam rosas ou vermelhas (OXOID, 2000).

Esse meio é altamente seletivo e nele não crescem algumas cepas de *Shigella*, como as cepas-R, por isso ele não é recomendado para isolamento primário desse gênero (LEIFSON, 1935) (TAYLOR e HARRIS, 1965).



Figura 15: Colônia fermentadora de lactose em Ágar SS® (esquerda) e cultura de *Samonella* spp com escurecimento do centro das colônias pela formação de H₂S.

Fonte: Acervo pessoal.

4.1.11 ÁGAR SANGUE®

O ágar sangue® é um meio enriquecido e não seletivo, apropriado para o isolamento primário de rotina para virtualmente todas as amostras biológicas (KONEMAN et al., 2001), favorecendo o crescimento da maioria das bactérias patogênicas e

permitindo o reconhecimento da produção de hemolisinas bacterianas (QUINN, et al., 2005).

Sua formulação consiste de 1% de extrato de carne, 1% de peptona neutralizada, 0,5% de cloreto de sódio e 1,5% de ágar, sendo esterilizado por autoclavação a 121 °C por 15 minutos. Após o meio ser resfriado a 50 °C é adicionado, na capela de fluxo laminar, 7% de sangue ovino estéril e distribuído pelas placas de petri (OXOID, 2000).



Figura 16: Placa de Ágar Sangue® com crescimento de *Malassezia* spp. Fonte: Acervo pessoal.

4.1.12 MEIO DE LOWENSTEIN-JENSEN®

O meio de Lowenstein é o meio de cultura mais utilizado para o isolamento, identificação e conservação de micobactérias. De acordo com a modificação de Jensen, é acrescentado no preparo do meio à base de Lowenstein uma suspensão de ovos frescos, apresentando vantagens como permitir o crescimento de uma ampla variedade de micobactérias, podendo ser utilizado para a prova de niacina.

Além disso, essa modificação de Jensen inclui uma concentração de verde malaquita para evitar o crescimento da maioria dos contaminantes. A principal desvantagem desse meio, que tem ovos como base, é a sua contaminação por microrganismos proteolíticos, que podem causar a liquefação do meio (BRASIL, 2005) (DIFCO e BBL, 2003).

4.2 MEIOS SEMI-SÓLIDOS

Os meios semi sólidos possuem pouco ágar® em sua composição, podendo indicar o metabolismo energético de determinado organismo a partir do local onde houve o crescimento biológico. Pode ser aerófilo estrito, microaerófilo, anaerófilo estrito e

facultativo.

4.2.1 CALDO TIOGLICONATO®

Este meio foi inicialmente criado para o cultivo de microrganismos aeróbios e anaeróbios usados em testes de esterilidade de produtos biológicos, principalmente de soluções contendo conservantes mercuriais (OXOID, 2000).

É um meio semi sólido, não seletivo, capaz de identificar o tipo de metabolismo utilizado pelos microrganismos, sendo aeróbios, microaeróbios, anaeróbios facultativos ou anaeróbios obrigatórios.

O crescimento se apresenta por uma turbidez no meio, e quando ocorre ausência de crescimento o meio continua translúcido. Caso a turbidez esteja na parte superficial do caldo, significa que esse microrganismo é aeróbio, se a turbidez estiver em uma linha um pouco abaixo da superfície, esse organismo é microaerófilo, supondo que haja crescimento por todo o meio, confirmamos que a colônia é anaeróbia facultativa, e quando houver apenas crescimento no fundo do tubo, ele possui uma rota metabólica anaeróbia obrigatória (QUINN et al, 2005)

Alguns organismos microscópicos que produzem fermentação intensa, podem sofrer desnaturação pelo baixo pH resultante, sendo assim, devem ficar em cultivo no caldo com tiogliconato por no máximo 4 (quatro) dias (OXOID, 2000)

A antiga prática de inoculação rotineira de caldo com tiogliconato para isolar anaeróbios ocultos, já foi abandonada em muitos laboratórios, principalmente por levar à recuperação de um grande número de contaminantes (KONEMAN et al, 2001).

4.3 MEIOS LÍQUIDOS

Os meios líquidos não têm ágar® em sua formulação, assim, o crescimento de microrganismos nesse tipo de meio se caracteriza pela turvação dele, podendo haver falsos positivos caso o material inoculado de imediato já provoque a turbidez do caldo, como amostras de sangue ou de leite, por exemplo.

4.3.1 CALDO BHI®

É um meio líquido, sendo que BHI são as siglas dos termos em inglês “*Brain and Heart Infusion*” que significam “Infusão de Cérebro e Coração”, tendo esse nome devido

ao fato de seus nutrientes serem derivados desses respectivos órgãos, além de conter peptona, que junto da infusão são fontes de nitrogênio, carbono, enxofre e vitaminas, e dextrose, que é um carboidrato utilizado para fermentação por parte dos microrganismos (ANVISA, 2004).

O caldo BHI® é destinado à cultura de microrganismos como bactérias, fermentadoras ou não, leveduras e outros fungos.

4.3.2 CALDO MUELLER HINTON®

Possui as características bioquímicas semelhantes ao Ágar Mueller Hinton®, com a diferença de que não possui ágar em sua composição, sendo um meio líquido. No laboratório de Microbiologia Médica Veterinária do Hvet da UnB, ele é usado para, após ter sido feito a cultura nesse caldo, inoculá-la em placa de petri contendo Ágar Mueller Hinton® para teste de difusão em disco de antimicrobianos.

5. TESTES BIOQUÍMICOS

Os testes bioquímicos são importantes para diferenciar as características metabólicas e bioquímicas de diversos microrganismos.

5.1 ÁGAR SIM®

O Ágar SIM® é um meio que indica três características distintas dos microrganismos: a produção de sulfeto, de indol e a observação da motilidade.

Esse meio auxilia na identificação de *Enterobacteriaceae*, por exemplo, na diferenciação de *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Serratia* spp (BLAZEVIÉ, 1968).

O procedimento do teste consiste na inoculação bacteriana, por meio de uma agulha estéril, até um terço da profundidade do meio. Deve-se ser incubado a 35 – 37 °C por 18 a 24 horas ou mais, se necessário (OXOID, 2000).

Após o tempo de inoculação é examinada a motilidade, característica pela turvação do meio; a produção de sulfeto de hidrogênio, produto da redução do sulfato, e a substituição química posterior que resulta no sulfeto ferroso, formando corpo enegrecido ao longo da linha de inoculação; e por fim, a produção de indol a partir do triptofano, indicada após adicionar um ml de xilol na superfície do meio, agitá-lo, e enfim derramar

0,5 ml de reativo de Erlich nas paredes do tubo, resultando em um anel de cor vermelha ou rósea logo abaixo da camada do xilol, caso for indol positivo. Caso contrário, não há mudança de coloração (OXOID, 2000) (OLIVEIRA, 2000).

5.2 ÁGAR TRIPLE SUGAR IRON® (ÁGAR TSI®)

O TSI® é comumente utilizado para diferenciar enterobactérias. Esse meio é sólido e possui três açúcares: glicose, sacarose, lactose. Dependendo dos resultados, podemos saber se o microrganismo isolado fermenta glicose, caracterizado por uma reação ácida no fundo do tubo, de cor amarela, e alcalina na superfície, de cor vermelha; se ele fermenta glicose, sacarose e lactose, havendo reação ácida em todo o meio, tornando-se amarelo no fundo e na superfície do tubo; se há ou não produção de gás a partir da fermentação do(s) açúcar(es), como substrato (além da produção de ácido); e se ocorre a produção de H₂S, sendo evidenciado por uma produção de corpo enegrecido no fundo do tubo (OLIVEIRA, 2000).

A liberação de gás sulfídrico, formada devido à ação da enzima cisteína desulfidrase - presente em algumas bactérias - sobre aminoácidos presentes no meio de cultura, é determinada por esse teste. As bactérias, quando cultivadas em meio contendo peptona, reduzem o enxofre por hidrogenação, produzindo H₂S. Este se junta aos íons férricos, formando sulfato ferroso, em precipitado negro insolúvel (OLIVEIRA, 1995).



Figura 17: Ágar TSI® H2S positivo.
Fonte: Acervo pessoal.

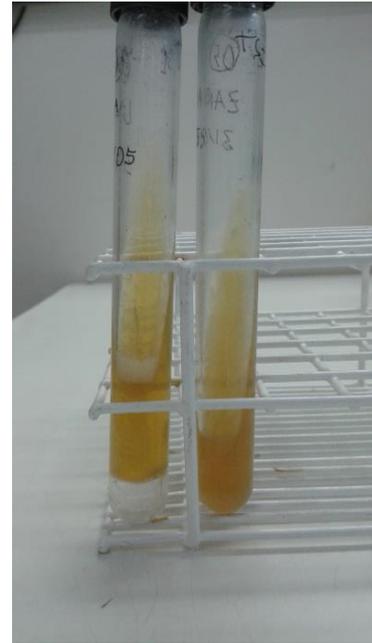


Figura 18: Ágar TSI® com os açúcares fermentados e com formação de gás. Fonte: Acervo pessoal.

5.3 CALDO ENTEROCOCCOSEL®

O Caldo Enterococcosel® ou Caldo Bile Azida Escullina®, é um caldo seletivo para cultivo e identificação de bactérias do gênero *Enterococcus* spp. Devido à combinação de esculina com uma baixa concentração de bÍlis bovino associado à azida de sÓdio, permite diferenciar entre *Enterococcus* spp e outras bactÍrias, principalmente de *Streptococcus* spp.

Os *Enterococcus* spp tÍm a capacidade de hidrolisar a esculina em esculina, que reage com o citrato fÍrrico de amÓnio, formando um complexo enegrecido. AlÍm disso, a bÍlis bovina inibe as bactÍrias gram positivas diferentes dos enterococos, enquanto a azida sÓdica inibe as gram negativas, salvo a *Streptococcus pyogenes* e a *Escherichia coli* respectivamente, que possuem inibiçÓes parciais (BBL MANUAL, 2006).

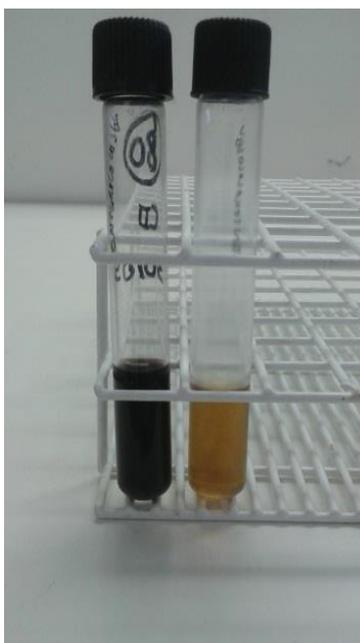


Figura 19: Caldo Enterococcosel® com reação positiva, causando o escurecimento do meio (esquerda), e sem reação (negativo), sem alteração da cor original do caldo (direita). Fonte: Acervo pessoal.

5.4 TESTE DA CATALASE

Observando a reação de determinada colônia quando em contato direto com o peróxido de oxigênio, esse teste avalia se a bactéria em questão possui ou não a enzima catalase.

A catalase é produzida por várias bactérias aeróbias estritas e anaeróbias facultativas, não sendo sintetizadas por anaeróbias estritas (QUINN et al, 1994).

Esse teste tem baixo custo e é usado rotineiramente em laboratórios de microbiologia para fazer a triagem de diferentes bactérias para se aferir o gênero ou família a qual ela pertence (QUINN, 2005).

Para o procedimento do teste, deve-se utilizar uma alça bacteriológica previamente flambada – não podendo ser resfriada em ágar sangue®, devido a presença da catalase nos eritrócitos –, coletando-se a colônia a ser testada e a inoculando em uma ou duas gotas de água oxigenada previamente derramadas sobre uma lâmina de vidro (OLIVEIRA, 2000). Caso o organismo testado produza a enzima, ela vai decompor o H₂O₂ em água e gás oxigênio, liberando bolhas de gás no meio, sendo o teste positivo. Se não houver formação de borbulhas, o teste é considerado negativo.

Os resultados positivos podem variar em intensidade, podendo ser mais fortes ou

mais fracos, sendo que qualquer formação de bolhas indica a positividade do teste.

5.5 TESTE DA COAGULASE LIGADA OU FATOR DE AGLUTINAÇÃO OU “CLUMPING FACTOR”

Esse teste tem como objetivo principal a diferenciação de espécies do gênero *Staphylococcus*, determinando se há a produção da enzima coagulase ligada à célula ou “clumping factor”.

Para reproduzir o teste, deve-se misturar uma gota de suspensão homogênea densa (uma colônia bacteriana misturada em uma gota de água destilada estéril ou solução salina) a outra gota de plasma comercial de coelho sobre uma lâmina de vidro (MARTINEZ, T. C. N. et al, 2001). Se por volta de 30 a 120 segundos ocorrer a formação de “grumos” ou “clumping”, significa que houve acúmulo dos microrganismos semelhante à uma aglutinação, causado pelas proteínas de ligação ao fibrinogênio na superfície bacteriana, convertendo diretamente fibrinogênio em fibrina insolúvel, sendo o resultado positivo (GOMES, M. J. P., 2013).

5.6 TESTE DA COAGULASE LIVRE OU COAGULASE EM TUBO

Este teste objetiva determinar diferentes espécies de *Staphylococcus* pela verificação da presença da enzima coagulase livre, uma exoenzima que causa ativação específica da trombina plasmática, levando a conversão de fibrinogênio em fibrina, resultando na formação de coágulo (GOMES, M. J. P., 2013).

Para a realização do teste, inocula-se uma colônia, normalmente sendo confirmada por testes laboratoriais para o gênero *Staphylococcus*, em um tubo contendo plasma comercial de coelho, sendo incubada a 37 °C. São feitas oito leituras de 30 em 30 minutos pelas primeiras quatro horas e, caso não haja mudança do estado físico do meio, outra leitura é feita 24 horas após a inoculação. Se houver formação de coágulo, em qualquer grau, o teste é considerado positivo. Caso não haja formação de coágulos o teste é negativo (MARTINEZ, T. C. N. et al, 2001).

5.7 TESTE DA DESCARBOXILASE E DIIDROLASE

A diidrolase e as descarboxilases são enzimas específicas capazes de atacar

aminoácidos distintos no grupo NH_2 e na ligação carboxílica ($-\text{COOH}$), respectivamente. Esse processo resulta na liberação de amina e CO_2 , causando uma alcalinidade no meio (OLIVEIRA, 2000).

Os aminoácidos testados na rotina do Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária do HVET da UnB são a arginina, a lisina e a ornitina. Os testes são feitos pela inoculação de colônias puras nos meios: Caldo Descarboxilase®, que não possui aminoácidos em sua composição, sempre feito concomitantemente aos outros testes, servindo como controle para interpretá-los; Caldo Lisina Descarboxilase®, que aponta a capacidade bacteriana de descarboxilar a lisina na amina primária cadaverina; Caldo Ornitina Descarboxilase®, que demonstra se a bactéria é capaz de transformar ornitina em putrescina, uma amina primária; Caldo Arginina Dihidrolase®, que evidencia caso o microrganismo possui a capacidade de diidrolisar a arginina em citrulina – retirando o grupo NH_2 da arginina, por meio da enzima diidrolase – e em seguida a citrulina é convertida em ornitina a qual é descarboxilada, resultando na putrescina (ANVISA, 2000).

O procedimento e interpretação dos testes ocorre da seguinte forma: após o microrganismo ser inoculado no meio – com quatro milímetros de parafina líquida previamente distribuída sobre a superfície dele -, ele é incubado por até 72 horas, sendo examinado diariamente. Por causa do indicador púrpura de bromocresol, numa primeira etapa, os meios vão ter sua coloração alterada de roxo para amarelo, devido à fermentação da glicose, que tem como substrato um ácido, diminuindo o pH do meio. Em seguida, nos meios que possuem aminoácidos em sua formulação, caso as bactérias tenham a enzima descarboxilase ou diidrolase (no caso do teste da arginina), elas irão atacar os aminoácidos, os transformando em aminas, as quais aumentam o pH do meio fazendo com que a coloração volte para a cor roxa (MBIOLOG1) (MBIOLOG2).

É importante lembrar que o Caldo Descarboxilase®, que têm a função de controle, por não possuir aminoácidos sempre deve se manter com a cor amarela (a não ser que o organismo não fermente glicose), sendo necessário a inoculação em conjunto do caldo controle e dos caldos com aminoácidos os quais desejamos examinar a atividade enzimática.

5.8 TESTE DA ESCULINA

Esse teste é baseado na capacidade que algumas bactérias, em presença de bÍlis, de hidrolisar esculina. A esculina é um glicosÍdeo derivado da cumarina (heterosÍdeo), o qual as duas moléculas desse composto (glicose e 7-hidroxycumarina) estão unidas por

uma ligação éster através do oxigênio.

A colônia é inoculada em Ágar BÍlis-Esculina® que contém, incorporado à esculina, 4% de sais biliares. Assim, as bactérias Bile-Esculina positivas são capazes de crescer na presença de sais biliares, hidrolisando a esculina em esculetina e glicose. A esculetina reage com íons férricos – fornecidos pelo citrato férrico, um composto inorgânico – formando um complexo negro (ANVISA, 2000). Quando não há alteração no meio ou apenas leve escurecimento (parcial) o resultado é considerado negativo (OLIVEIRA, 2000)

Esse meio é comumente utilizado para a diferenciação entre enterococos/estreptococos do grupo D e outros estreptococos (FACKLAM, 1973), além de poder ser usado, também, para a identificação presuntiva de outros microrganismos, como do grupo *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* (CHAN e PORSCHEN, 1975).

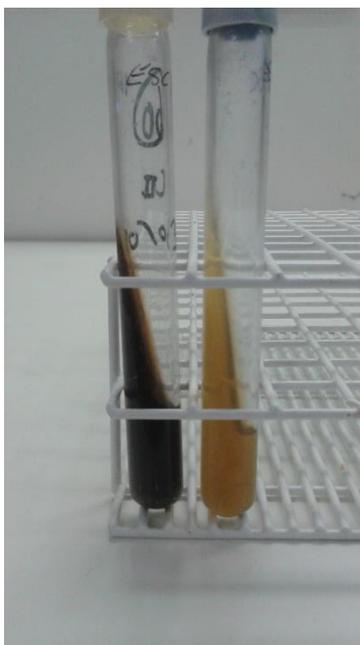


Figura 20: Teste de esculina positivo, com escurecimento do meio (esquerda), e negativo, sem alterações cromáticas (direita). Fonte: Acervo pessoal.

5.9 TESTE DA FENILANINA

O objetivo desse teste é determinar a capacidade da bactéria, por ação enzimática, de produzir ácido fenilpirúvico a partir da fenilalanina (ANVISA, 2004).

O meio utilizado para esse teste é o Ágar Fenilalanina®, inoculando a colônia em tubos com o meio em forma de bixel por 18 a 24 horas a 37 °C. Após o período de

incubação, deve-se derramar 0,2 ml de solução de $FeCl_3$ a 10% sobre o cultivo, revelando a atividade da enzima fenilalanina desaminase ao ocorrer a mudança de coloração do meio para a cor verde, sendo esse ágar originalmente de cor amarela pálida. Essa atividade enzimática é característica do gênero *Proteus* spp (OLIVEIRA, 2000).

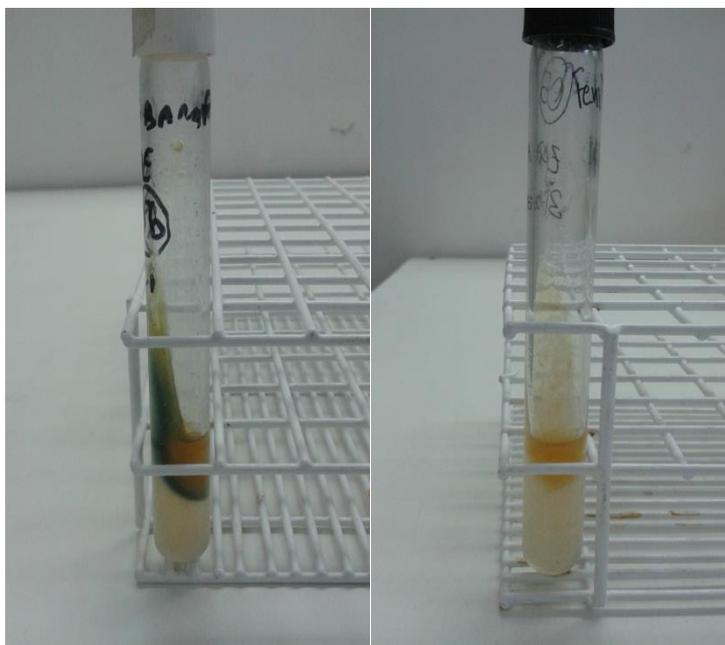


Figura 21: Teste da fenilalanina positivo, apresentando reação de cor verde (esquerda), e negativo, sem apresentar reação alguma (direita). Fonte: Acervo pessoal

5.10 TESTE DA FERMENTAÇÃO DE AÇÚCARES

Baseado na capacidade de uma bactéria em fermentar determinados carboidratos incorporados ao meio de cultura, o teste determina a produção de ácido ou ácido e gás (OLIVEIRA, 2000), sendo amplamente utilizado para diferenciar gêneros e identificar espécies bacterianas (ANVISA, 2004).

No Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária do HVET da UnB, na rotina, são utilizados os testes dos carboidratos: glicose, sacarose, lactose, manitol, dulcitol, salicina, sorbitol, arabinose, rafinose, rhamnose, xilose, trehalose e maltose.

Os microrganismos são inoculados em tubo com meio base para açúcar – há um carboidrato diferente, misturado à base para açúcar, para cada teste – e incubados a 35-37 °C por 24h. Depois do tempo de incubação, observa-se o crescimento, evidenciado por uma turvação no meio e pela mudança de cor, do vermelho para o amarelo, ocorrida pela

reação do ácido, produzido pela fermentação, com o vermelho de fenol. Caso não haja crescimento, o meio mantém sua coloração original e o resultado é dado como negativo. Para provas negativas é recomendada a incubação por 48 horas. (ANVISA, 2004).

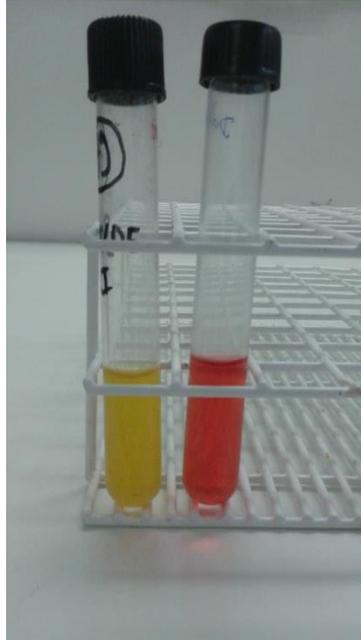


Figura 22: Teste de fermentação de açúcares positivo, causando a mudança de coloração do meio pela produção de ácidos advindos do processo fermentativo (esquerda), e negativo, sem a produção de ácidos e sem mudança de cor (direita).

Fonte: Acervo pessoal.

5.11 TESTE DA GELATINASE

O teste visa determinar a capacidade de uma determinada bactéria produzir a enzima gelatinase, responsável pela liquefação da gelatina (OLIVEIRA, 2000).

Utiliza-se o meio Ágar Gelatina® - que é não seletivo - em tubo, inoculando o microrganismo profundamente nele e o incubando a 37 °C. Deve-se fazer leituras diárias, transferindo o tubo para uma geladeira ou água gelada por uma ou duas horas, para observar a ação das enzimas proteolíticas que liquefazem a gelatina (OXOID,2000) (OLIVEIRA, 2000).

A maioria dos microrganismos hidrolisam a gelatina em poucos dias, enquanto outros têm taxas de liquefação que podem chegar a semanas, como algumas cepas de *Enterobacter cloacae*, que liquefazem a gelatina somente após três meses (WINDLE TAYLOR, 1958).

Para fins práticos, é sugerido um período máximo de incubação de 14 dias (COWAN e STEEL, 1966) (WILSON e MILES, 1964).

5.12 TESTE DA MOTILIDADE

O teste da motilidade pode ser feita com culturas em meio SIM®, podendo prejudicar a leitura devido à possível formação de H₂S, ou em meio Motilidade®, que é o meio comumente utilizado na rotina do Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária do Hospital Veterinário de Pequenos Animais (HVET) da Universidade de Brasília (UnB).

O teste consiste na inoculação profunda, perfurando o ágar de 4 a 5 cm, lentamente, por meio de agulha bacteriológica, incubando-o a 37 °C por 18 a 24 horas (ANVISA, 2004). Caso o meio se torne turvo, significa que os microrganismos móveis migraram pelo meio, caso contrário, as bactérias imóveis cresceram confinadas ao local de inoculação (OLIVEIRA, 2000).

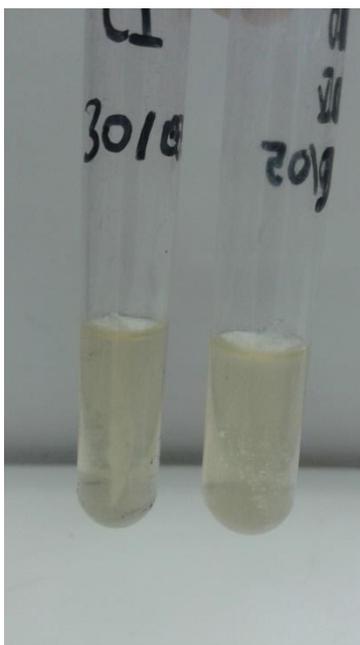


Figura 23: Formação de crescimento em aspecto de nuvem, significando resultado de motilidade positivo (esquerda), e ausência de motilidade (direita). Fonte: Acervo pessoal.

5.13 TESTE DA OXIDAÇÃO E FERMENTAÇÃO

Esse teste tem a finalidade de verificar a capacidade do organismo em utilizar

carboidratos pela via oxidativa ou fermentativa ANVISA, 2004).

A utilização de açúcares por bactérias pode ocorrer por um dos dois processos, sendo ou fermentativo ou oxidativo. Algumas bactérias são capazes de metabolizar os açúcares, produzindo ácido, apenas na presença de gás oxigênio (aerobiose), enquanto outras produzem esses ácidos apenas na ausência desse gás (anaerobiose). Também existem bactérias capazes de produzi-los tanto em aerobiose quanto em anaerobiose (OLIVEIRA, 2000).

Assim, a fermentação é um processo anaeróbio feita por bactérias anaeróbias estritas ou facultativas, fosforilando a glicose em glicose-6-fosfato antes de ser metabolizado. Já a oxidação é um processo aeróbio, feito, normalmente, por bactérias aeróbias estritas, não sendo necessária a fosforilação da glicose no processo de oxidação. (OLIVEIRA, 2000).

O teste é feito inoculando uma colônia de origem pura em dois tubos com o Meio de Hugh Leifson® ou Meio Base OF® (no Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária do HVET da UnB, utiliza-se a glicose como fonte de carboidrato), com um desses tubos contendo uma camada de parafina líquida em sua superfície. Os tubos são incubados a 37 °C por até 14 dias, sendo examinados diariamente (OLIVEIRA, 2000).

Para interpretar o teste, visualiza-se se houve mudança de coloração, do verde para o amarelo. Caso o meio do tubo com parafina tenha mudado de cor, a bactéria tem metabolismo fermentativo, podendo haver, também, mudança no tubo sem parafina. Se apenas o meio do tubo sem parafina mudar de cor, significa que o organismo tem metabolismo oxidativo. Admitindo que ambos os tubos continuaram com a coloração original, o microrganismo não metaboliza o carboidrato presente no meio e o resultado é não reativo (OLIVEIRA, 2000).

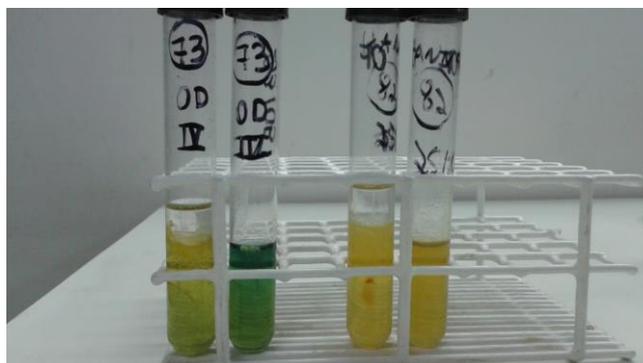


Figura 24: Testes de O/F fermentativos, sendo um dos microrganismos anaeróbio obrigatório (esquerda), e outro anaeróbio facultativo (direita). Fonte: Acervo pessoal.

5.14 TESTE DA OXIDASE

Com o objetivo de diferenciar principalmente as bactérias gram negativas, esse teste define se há produção do citocromo oxidase C pelo microrganismo testado. Geralmente, ele está presente em apenas organismos aeróbios, fazendo com que eles utilizem o oxigênio como receptor de hidrogênio, resultando na redução do oxigênio da forma molecular para o peróxido de hidrogênio (OLIVEIRA, 2000).

As bactérias que produzem a enzima oxidase apresentam um sistema de transporte de elétrons denominado sistema citocromo oxidase. Os aceptores eletrônicos naturais, neste sistema, podem ser substituídos por substratos artificiais, que em contato com o oxigênio atmosférico são oxidados pela citocromo oxidase, formando um composto colorido (Mac Faddin, J. F., 1976).

O teste baseia-se na coleta de colônias puras por meio de uma alça de platina – sendo que as alças à base ferro podem causar falsos positivos pela oxidação desse elemento –, friccionando-as contra uma fita que contém esses substratos artificiais. A positividade do teste evidencia-se pela mudança de coloração da fita de branco para púrpura ou azul, normalmente sendo imediata, caso contrário o teste é considerado negativo.



Figura 25: Teste de oxidase positivo, com mudança de cor da fita de branco para púrpura (esquerda), e negativo, sem mudança de cor da fita (direita), sendo que a coloração rosa observada é original da própria colônia, pois, sendo uma fermentadora de lactose, foi coletada a partir do Ágar MacConkey®. Fonte: Acervo pessoal.

5.15 TESTE DA UREASE

O teste da urease tem como objetivo determinar a capacidade das bactérias de hidrolisar a ureia, formando moléculas de amônia, que alcalinizam o meio, através da ação da enzima urease (OLIVEIRA, 2000).

O meio utilizado para o teste é o Ágar Base Ureia® desenvolvido por Christensen (CHRISTENSEN, 1946), que possui dextrose como fonte energética, uréia como fonte de nitrogênio para organismos positivos para a enzima urease, dentre outras substâncias que servem tanto para permitir o equilíbrio osmótico e eletrolítico do meio (ACUMEDIA, 2010).

Os resultados positivos são caracterizados pela mudança da coloração do meio, de amarelo pálido para rosa vivo ou brilhante, sendo que as bactérias do gênero *Proteus* spp têm resultados positivos dentro de até, aproximadamente, seis horas, enquanto outras bactérias da família Enterobacteriaceae apresentam resultados positivos por volta de até 24 horas após a inoculação. É de importância saber que caso a leitura do teste seja feita mais de uma semana após a inoculação, o resultado pode ser um falso positivo, pois os substratos da reação das bactérias que utilizam a peptona como fonte de nitrogênio, são alcalinos (ACUMEDIA, 2010).

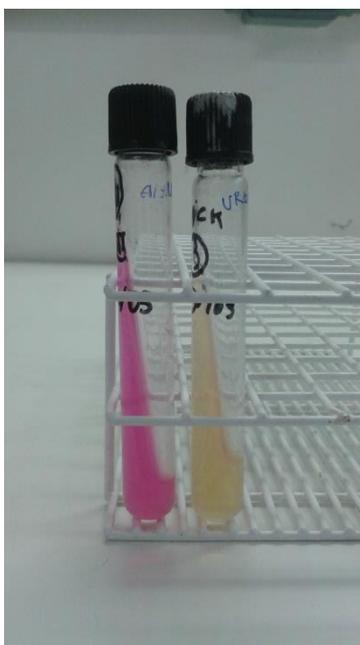


Figura 26: Meio Base Uréia® positivo, apresentando coloração rosa (esquerda), e negativo (direita), sem alterações. Fonte: Acervo pessoal.

5.16 TESTE DE REDUÇÃO DE NITRATOS

Feito por meio da cultura bacteriana em Caldo Nitrato®, esse teste tem como objetivo determinar a capacidade do microrganismo de reduzir nitrato (NO₃) a nitrito (NO₂) ou gás nitrogênio (N₂) (OLIVEIRA, 2000).

Para o procedimento desse teste, uma colônia pura deve ser inoculada no caldo, sem agita-lo, e incubado a 35 – 37 °C por 24 a 48 horas, sendo, algumas vezes, necessário que haja a incubação por até cinco dias. Depois desse período, após ter sido verificado se houve crescimento no meio e produção de bolhas de gás no tubo – o que significa que houve desnitrificação, ou seja, redução de nitrato a gás nitrogênio -, adiciona-se cinco gotas da solução A e B (descritas abaixo). Caso haja o desenvolvimento de cor vermelho tijolo, sendo que a cor original do meio é incolor a palha, significa que a bactéria reduziu nitrato a nitrito, sendo o resultado do teste positivo (ANVISA, 2004).

Solução A:

Ácido sulfanílico ----- 0,8g

Ácido acético 5N ----- 100 ml

Solução B:

N, N-dimetil-1-naftilamina ----- 0,6 g

Ácido acético 5N* ----- 100 ml

* Ácido acético 5N

Ácido acético glacial ----- 40 ml

Água destilada ----- 100 ml

Fonte: OLIVEIRA, 2000.

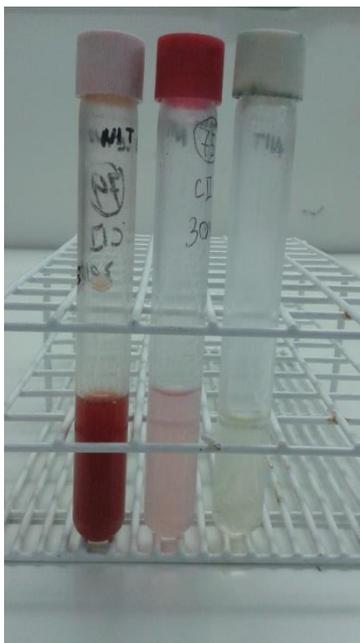


Figura 27: Reação da redução de nitratos em diferentes intensidades, apresentando mudança da cor original do meio (esquerda e centro), e ausência de redução, sem alteração de cor (direita). Fonte: Acervo pessoal.

5.17 TESTE DE VOGES PROSKAUER® (VP) OU TESTE DA PRODUÇÃO DE ACETOÍNA

Esse teste afere a produção de acetilmetilcarbinol pela via butilenoglicólida, derivado da fermentação da glicose (OLIVEIRA, 2000).

Ele é feito no mesmo meio que o teste do VM (Caldo VM/VP®), sendo que, após realizar o teste para VM, é adicionado, no mesmo tubo, 0,6 ml de solução alfa naftol a 5% (solução 1)* e 0,2 ml de solução aquosa de KOH a 40% (solução 2)**. Logo em seguida, o tubo é agitado para homogeneizar a solução, e inclinado com o objetivo de aumentar a superfície de contato com o ar. Caso haja a produção de acetoína, em 15 minutos depois do tubo ser inclinado, a reação positiva é revelada por coloração vermelha forte (OLIVEIRA, 2000). Reações negativas ficam amarronzadas ou amareladas.

*Solução 1: 5% de alfa naftol em álcool etílico absoluto.

**Solução 2: 40% de hidróxido de potássio, contendo 0,3% de creatina.

Fonte: OLIVEIRA, 2000.



Figura 28: Teste de VP® positivo, com cor avermelhada após de se ter adicionado as soluções e deixar reagir com o ar atmosférico por cerca de 15 minutos. Fonte: Acervo pessoal.

5.18 TESTE DO CITRATO

Esse teste tem por objetivo determinar as bactérias que são capazes de utilizar o citrato de sódio como única fonte de carbono, juntamente com sais de amônia - obtendo energia sem usar a fermentação ou a produção de ácido láctico -, alcalinizando o meio e multiplicando-se bem no Ágar Citrato de Simmons®, sendo o crescimento acompanhado de mudança da cor verde, que é a coloração original, para a azul (OLIVEIRA, 2000) (ANVISA, 2004)

Após autoclavado, o meio é distribuído, na forma de bixel, em tubos e, após ter se resfriado e solidificado, pode-se inocular o microrganismo em estria sem furar a base. A leitura é feita de 24 a 48 horas após a incubação a 35-37 °C (OXOID, 2000)

Esse teste é recomendado, principalmente, para a diferenciação de bactérias da família *Enterobacteriaceae* (EWING e EDWARDS, 1960).



Figura 29: Teste do citrato positivo, com coloração azulada (esquerda), e negativo, sem mudança de cor (direita). Fonte: Acervo pessoal.

5.19 TESTE DO HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO (KOH)

Sendo simples e barato, esse teste determina, com melhor eficiência que a coloração de gram, se a bactéria em questão é gram positiva ou negativa, ou seja, se ela possui em sua parede celular uma camada espessa de peptidoglicanos ou uma camada delgada, sobreposta por uma membrana externa de lipopolissacarídeos.

O teste é feito derramando de uma a duas gotas de KOH 3% sobre uma lâmina de microscopia, seguindo da mistura de uma colônia previamente coletada por meio de alça bacteriológica – anteriormente flambada em bico de Bunsen – ao hidróxido de potássio por 30 segundos.

Observa-se se houve mudança de viscosidade do conteúdo, após os 30 segundos, afastando e aproximando repetidamente a alça, podendo formar um fio viscoso.

Caso haja a formação de um fio viscoso, significa que a bactéria possui uma parede celular delgada, ou seja, é uma bactéria gram negativa, ocorrendo a lise celular pela destruição dessa parede, que é sensível ao KOH 3%, havendo a exposição do material genético, se misturando no meio e causando o aumento da viscosidade dele (QUINN et al, 2005).

Se não houve a formação de liga viscosa, então a parede celular da bactéria é resistente ao hidróxido de potássio a 3%, possuindo uma parede celular espessa

composta por cadeias de peptidoglicanos, sendo, então, uma bactéria gram positiva. Assim, não ocorre a lise celular e nem a exposição do DNA, sem resultar em alterações de viscosidade no meio (QUINN et al, 2005).

Podem ocorrer resultados falso positivos e falso negativos. Os falsos positivos podem ocorrer devido à inoculação de uma carga muito grande de bactérias, fazendo com que a solução fique gelatinosa, ou pela inoculação de colônias mucoides. Os falsos negativos se dão pela grande quantidade de solução KOH em relação à colônia testada (VALIZADEH, B., DCLS).

5.20 TESTE DO INDOL

Com o objetivo de evidenciar a formação de indol a partir da degradação do triptofano, por algumas bactérias, esse teste, detectado por reagentes, produz uma coloração avermelhada (OLIVEIRA, 2000).

Para esse teste, a bactéria é inoculada em meio de cultivo água peptonada® - contendo apenas peptona, água destilada e cloreto de sódio – e incubada por 24 – 48 horas a 37 C. Após o período de incubação, é adicionado ao meio, um ml de xilol. Em seguida o tubo é agitado para depois derramar 0,5 ml de reativo de Erlich® nas paredes do tubo. Caso tenha acumulado indol pelo xilol, um anel de cor vermelha ou rosa é formado logo abaixo da camada de xilol, sendo a reação positiva. Se não houver mudança na coloração, mantendo-se cor palha, a reação é negativa (OLIVEIRA, 2000).

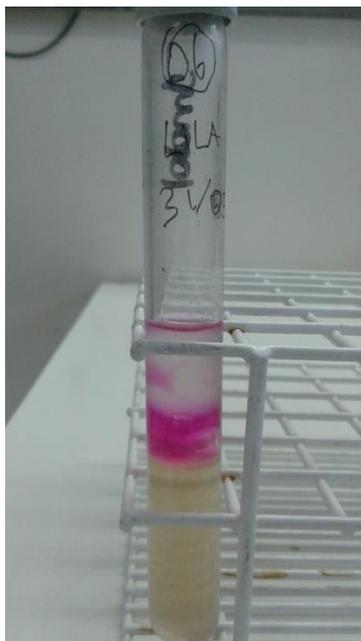


Figura 30: Teste do indol positivo, apresentando um halo de cor rosa. Fonte: Acervo pessoal.

5.21 TESTE DO MALONATO

Esse teste determina a capacidade de um organismo em utilizar malonato de sódio como única fonte de carbono, resultando na alcalinidade do meio por causa da formação de NaOH. Também é interessante saber que o malonato é inibidor da enzima succinil desidrogenase, que participa do ciclo de Krebs. Isso porque, o ácido malônico, que é estruturalmente similar ao ácido succínico, compete por um local na enzima. Assim, quando ocorre o acúmulo do ácido succínico devido a inibição enzimática, o ciclo de Krebs é interrompido (OLIVEIRA, 2000).

Para se poder interpretar o teste, o microrganismo deve ser inoculado em Caldo Malonato® e incubado a 35 – 37 °C por 24 a 48 horas, sendo observado diariamente. Os organismos que forem positivos vão alcalinizar o meio, podendo produzir uma cor azulada mais forte ou mais fraca. Já os que são negativos, não vão apresentar mudanças na coloração do caldo, se mantendo verde, ou podem mudar para a cor amarela pela fermentação da glicose (ANVISA, 2004).

5.22 TESTE DO VERMELHO DE METILA® (VM)

Baseando-se no uso do indicador vermelho de metila, o teste determina o pH

quando uma bactéria fermenta glicose.

Nesse teste, a colônia é inoculada no Meio de Clark Lubs®, também chamado de Caldo VM/VP®, e é incubado de 2 a 5 dias a 37 °C. Após 18 a 24 horas de incubação, a fermentação produz metabólitos ácidos. Conquanto, depois de dois a cinco dias incubado (tempo necessário para executar o teste), as bactérias que são VM positivas continuam produzindo ácido mantendo o pH baixo. Já os organismos que continuam metabolizando, por descarboxilação, os produtos iniciais da fermentação, produzem o acetilmetilcarbinol, de pH neutro, e são VM negativos (OLIVEIRA, 2000).

O teste é feito adicionando 5 gotas da solução para teste de VM ao meio previamente inoculado e incubado por 2 – 5 dias a 37 °C. Se houver formação de cor vermelha, o resultado é positivo; caso haja formação de cor laranja, o teste é considerado intermediário; não havendo mudança na coloração do meio, mantendo-se amarelo, o teste é negativo (OLIVEIRA, 2000).



Figura 31: Teste do VM® intermediário, apresentando coloração alaranjada após derramar-se o reagente. Fonte: Acervo pessoal.

6. EXAME CITOLÓGICO

O Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária recebe raspados de pele, ouvidos, dentre outros para a realização dos exames citológicos. As amostras devem estar devidamente identificadas, acompanhadas da ficha do animal corretamente

preenchida e da ficha de despesa. As lâminas histológicas acolhidas, contendo o material e ser analisado, são normalmente coradas pelo método de coloração de gram, permitindo a visualização e diferenciação genérica de bactérias e fungos, principalmente os leveduriformes, assim como a quantificação de bactérias e leveduras. Em casos especiais é usado o método de coloração Ziehl-Neelsen, para bactérias ácido resistentes, assim como é feito a coloração de dermatófilos com o azul de metileno.

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, em microscopia de campo escuro, se há a presença de *Leptospira* spp.

6.1 MÉTODO DE COLORAÇÃO DE GRAM

Esse método, criado pelo dinamarquês Hans Christian Joachim Gram em 1884, objetiva a visualização de microrganismos, observando sua morfologia, seu tamanho, a disposição de suas colônias, a pureza delas, e também para a diferenciação do Gram.

Inicialmente, deve-se identificar a lâmina histológica com grafite na superfície áspera ou com lápis termosensível na superfície lisa da lâmina de vidro, marcando com um ponto no lado direito do canto superior para indicar a superfície na qual serão colocados os organismos. Coloca-se uma gota de solução salina 0,9%, com uma alça de níquel-cromo estéril, na superfície da lâmina de vidro e se coleta uma pequena quantidade de colônias com a alça, aplicando-a na gota de solução salina e espalhando o material pela superfície da lâmina. As colônias são fixadas, por meio do calor, ao passar a lâmina brevemente pela chama do bico de Bunsen.

Para o procedimento de coloração deve-se posicionar a lâmina de vidro no suporte para coloração de lâminas e preencher o esfregaço com cristal violeta durante um minuto, escorrer o excesso do cristal violeta e derramar, por toda a superfície da lâmina, lugol por mais um minuto. Após esse período, deve-se tirar o excesso a superfície da lâmina e, com etanol 100% ou descorante, cobrir a lâmina por 10 segundos, lavando em seguida com água corrente de baixa pressão. Depois é colocado safranina ou fucsina na superfície da lâmina aguardando 30 ou 15 segundos respectivamente. Lava-se a lâmina em água corrente, colocando-a inclinada. Quando ela estiver seca, aplica-se uma gota de óleo de imersão sobre a lâmina, visualizando-a em microscópio óptico em aumento de 1000x. Analisa-se a morfologia dos organismos, a disposição das colônias e a classificação em Gram positiva ou negativa.

Os microrganismos corados com aspecto roxo serão classificados como Gram positivos e os microrganismos corados com aspecto avermelhado ou rosa serão classificados como Gram negativos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

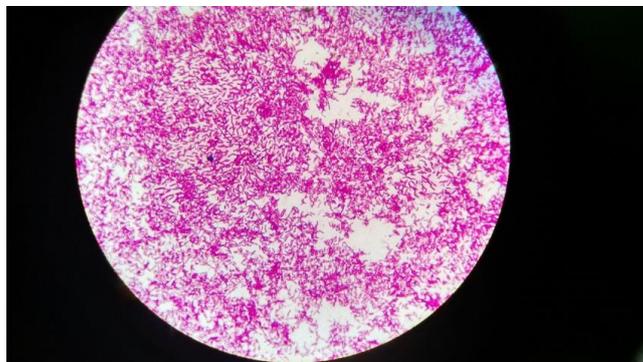


Figura 32: Visualização de bastonetes gram negativos, corados pelo método de coloração de gram, por meio de microscópio óptico. Fonte: Acervo pessoal.

Esse método serve tanto para visualizar a maioria das bactérias, quanto para observar diversas estruturas leveduriformes, sendo a levedura de maior incidência no Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária a *Malassezia* spp, caracterizada por um aspecto de “pegada” na microscopia óptica em aumento de 1000x.



Figura 33: Visualização de estruturas leveduriformes coradas com coloração de gram, com presença de pseudohifas. Fonte: Acervo pessoal.

6.2 MÉTODO DE COLORAÇÃO ZIEHL-NEELSEN

Desenvolvido por Franz Ziehl em 1882 e posteriormente alterado por Friedrich Neelsen, esse método é utilizado para corar bactérias, principalmente bastonetes como as micobactérias e actinomicetos, que são ácido resistentes, ou seja, que possuem em sua parede celular um alto teor de lipídeos estruturais, como o ácido micólico, e, portanto,

não se coram com o método de coloração de gram.

Primeiro, uma lâmina de vidro é identificada com grafite na superfície áspera ou com lápis termosensível na superfície lisa da lâmina, marcando com um ponto no lado direito do canto superior para indicar a superfície na qual serão colocadas as bactérias. Coloca-se uma gota de solução salina 0,9%, com uma alça de níquel-cromo previamente flambada, na superfície da lâmina histológica e é coletada uma pequena quantidade de colônias com a alça, aplicando-a na gota de solução salina e a espalhando pela superfície da lâmina. As colônias são fixadas, por meio do calor, ao passar a lâmina brevemente pela chama do bico de Bunsen.

Em seguida, cobre-se a totalidade do esfregaço com a solução de fuscina, aquecendo-a suavemente no bico de Bunsen em fogo baixo, na distância de aproximadamente 10 centímetros, para evitar que a solução ferva e as bactérias sejam destruídas, ocorrendo, assim, a evaporação da fuscina e a fixação do corante nas bactérias ácido resistentes. Essa etapa não deve durar mais do que 5 minutos. Após esse procedimento, lava-se o esfregaço em água corrente de baixa pressão e preenche-se a lâmina com álcool 100%, deixando reagir por volta de um minuto. Lava-se novamente no jato de água e é colocado o contraste azul de metileno sobre a lâmina de vidro, por volta de 30 segundos. Lava-se outra vez a lâmina, da mesma forma que foi feita anteriormente, tanto o esfregaço quanto a parte inferior da lâmina.

Deve-se deixar a lâmina secando em temperatura ambiente, e após seca, aplica-se uma gota de óleo de imersão sobre a lâmina, visualizando-a em microscópio óptico em aumento de 1000x. Observa-se se existem microrganismos ácido resistentes corados com aspecto rosa, sendo que as micobactérias, nesse método, apresentam-se como bastonetes rosas delgados e ligeiramente curvos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

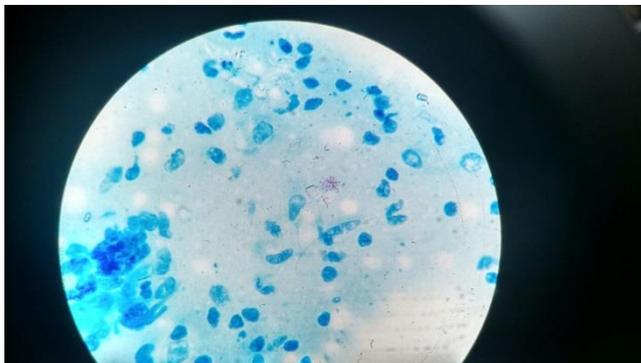


Figura 34: Visualização de *Mycobacterium* spp corada com o método Ziehl-Neelsen.

Fonte: Acervo pessoal.

6.3 AZUL DE METILENO E MÉTODO DA FITA ADESIVA

O corante Azul de Metileno, sintetizado por Heinrich Caro em 1876, é utilizado para coloração ou contraste de diversas estruturas microscópicas e métodos. Sua aplicação vai desde a coloração de fungos e bactérias até a coloração de células como neurônios, também sendo utilizado para contraste no método de coloração Ziehl-Neelsen.

No caso das estruturas fúngicas, esse corante é utilizado associado ao método da fita adesiva. Esse método consiste em pressionar uma fita de celofane transparente de maneira firme e suave sobre a superfície da colônia. Em seguida, a fita é posicionada sobre uma lâmina de vidro contendo uma gota de azul de metileno. O material é visualizado em microscópio óptico com o aumento de 400x (KONEAM et al, 2001). Dessa forma é possível observar estruturas como hifas, pseudohifas, micronídeos, macronídeos, esporos, dentre outras estruturas, permitindo o diagnóstico de diferentes fungos.

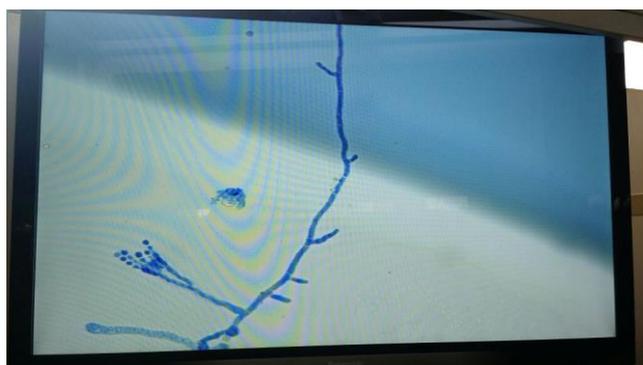


Figura 35: Visualização de microscopia óptica em televisão de *Penicillium* spp com o corante azul de metileno. Fonte: Acervo pessoal

Esse corante sintético, também é utilizado para a coloração de bactérias, como a *Dermatophilus congolensis*. Nesse caso, as amostras recebidas com suspeitas de dermatofiloses, sendo normalmente crostas, são maceradas em duas ou três gotas de KOH 10%. O material é esplalhado pela lâmina, por meio de uma alça bacteriológica, adicionando uma gota de azul de metileno. Em seguida, uma lamínula é sobreposta sobre o material. Coloca-se uma gota de óleo de imersão sobre a lamínula, visualizando-o em microscópio óptico em aumento de 1000x.



Figura 36: Visualização de *Dermatophilus congolensis* em microscopia óptica com azul de metileno. Fonte: Acervo pessoal.

6.4 MICROSCOPIA DE CAMPO ESCURO

No Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária, devido ao fato das espiroquetas não se corarem com a coloração de gram, a microscopia de campo escuro é majoritariamente utilizada para diagnósticos presuntivos de amostras de urina com suspeitas de *Leptospira* spp. Sendo uma bactéria gram negativa da família das espiroquetas, elas medem de 6 a 20 micrômetros de comprimento e cerca de 0,1 micrômetro de diâmetro, se apresentando morfológicamente espiralada e com movimentação vigorosa (OLIVEIRA, 2000).

O método de visualização dessas estruturas espiraladas consiste na distribuição da urina fresca a ser examinada em dois microtubos de 1,5 mL de urina, por meio de pipetadores e ponteiros estéreis, sempre utilizando equipamentos de proteção individual. Esse procedimento deve ser feito dentro da segurança da capela de fluxo laminar.

Em seguida, os materiais são centrifugados a 14000 G a 5 °C por 20 minutos e, de volta à capela de fluxo laminar, o sobrenadante é cuidadosamente descartado por meio de pipetador e ponteira esterilizada. Quando restar apenas o pellet nos microtubos, cada um deles é suspenso em 100 µL de PBS (pH 7.4). Assim, eles são homogeneizados pelo vórtex (POP 067).

Por fim, 10 µL da suspensão são colocados entre uma lâmina histológica e uma lamínula, todas as luzes do laboratório precisam ser apagadas, fazendo então, a

visualização em aumento de 1000X (POP 067).

A visualização de uma ou mais espiroquetas com morfologia e movimentação espiralada características indica um diagnóstico positivo para a presença de espiroquetas.

7. ISOLAMENTO E REPIQUE DE AMOSTRAS

Após o período de incubação, observa-se as características macroscópicas das colônias presentes na placa, visualizando a superfície do ágar em diferentes inclinações sob a incidência direta de luz artificial e, caso seja necessário, utilizar transiluminação para detectar a hemólise em determinadas colônias. Durante essa primeira inspeção visual, o microbiologista deve identificar colônias morfologicamente diferentes entre si, ou seja, colônias com cores, brilhos, bordas, relevos, aderência ao ágar e até mesmo tamanhos distintos (KONEMAN et al., 2001). Se houver mais de um tipo de colônia na placa, deve-se fazer o repique das colônias isoladas ou o isolamento caso as colônias diferentes estejam muito próximas ou juntas. O repique também é feito para aumentar a biomassa de células microbianas ou para transferir uma colônia para um novo meio de cultura.

O repique consiste quando 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).

Já o isolamento ocorre quando as colônias são semeadas em uma nova placa até o esgotamento do inóculo, ou seja, quando ele é progressivamente diluído a fim de se obter culturas isoladas que originarão colônias puras (SILVA; OLIVEIRA, 2007). Esse esgotamento é feito pelo estriamento de uma alçada de colônias na placa, após esse procedimento a alça é flambada e faz-se uma nova estria a partir do final dessa primeira estria. Faz-se mais uma ou duas estrias a partir da estria feita anteriormente, flambando a alça antes de cada nova estria. A figura 36 exemplifica visualmente o método de isolamento.

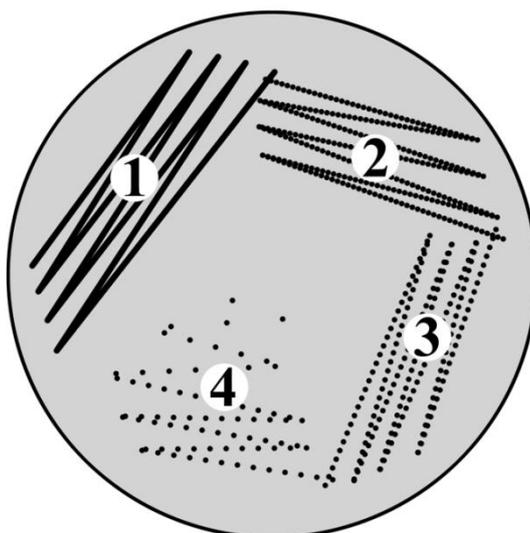


Figura 37: Esquema de esgotamento do inóculo para isolamento. Na figura está indicado a ordem de estrias feitas com a alça e seu aspecto após a incubação.

Fonte: PIRES, R. F. L. C., 2013.

8. TESTE DA DIFUSÃO EM DISCO (ANTIBIOGRAMA)

Assim que a bactéria for devidamente isolada e identificada, é de interesse clínico saber quais antibióticos serão eficientes no combate contra esse microrganismo, com o objetivo de eliminar o patógeno e obter sucesso no tratamento da doença. O teste da Difusão em Disco Também conhecido como Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos, ou método Kirby Bauer, ou Antibiograma consiste em determinar a sensibilidade *in vitro* de uma determinada bactéria frente a agentes antimicrobianos.

O antibiograma somente pode ser realizado em bactérias previamente isoladas e identificadas – salvo alguns casos especiais em que exame é de urgência e precisa de um tratamento eficaz o mais rápido possível, sendo feito primeiro o antibiograma e em seguida a identificação do patógeno –, e sempre dentro da área de segurança do bico de Bunsen. Primeiramente com o auxílio de uma alça calibrada, previamente flambada e resfriada, coleta-se uma colônia isolada e pura, inoculando-a em tubo de ensaio contendo Caldo Muller Hinton®. O material é incubado em estufa para crescimento bacteriológico a temperatura constante de 37°C por 24 horas ou até que haja turvação do meio. Após esse período, retira-se o tubo de ensaio da estufa e, com auxílio de um swab estéril mergulhado no meio, inocula-se e espalha-se o caldo. O swab é novamente submerso e seu material espalhado até que esse procedimento seja feito em várias direções em uma placa de Petri grande, ou duas médias, contendo Ágar Muller Hinton®, certificando-se que

a placa ficou completamente coberta pelo caldo contendo a amostra. No caso de microrganismos fastidiosos, utiliza-se Ágar Muller Hinton® acrescido de sangue. Após a placa ser totalmente coberta, com auxílio de uma pinça previamente esterilizada pelo fogo e novamente resfriada, coleta-se um disco de antibiótico de dentro do frasco, posicionando-o firmemente sobre o Ágar. Repete-se essa técnica em todos os antimicrobianos a serem testados, sendo esse total de pelo menos 10 antibióticos diferentes. Posteriormente, o material é incubado em estufa em 37 °C por 18 - 24 horas – podendo haver falhas nos resultados caso o organismo seja cultivado em estufa por mais de 24 horas –, fazendo-se a leitura do teste após esse período de incubação (LABORCLIN, 2011).

Os antibióticos são eleitos de acordo com a indicação, pois a concentração efetiva para ação antimicrobiana em cada sistema, ou até mesmo órgão, varia de acordo com o antimicrobiano utilizado. Eles também são escolhidos a partir da solicitação do médico veterinário requisitante.

A leitura desse teste é feita por meio da medição com régua ou paquímetro dos diâmetros dos halos formados pelos antibióticos no local onde não houve crescimento microbiano, sendo que os diâmetros das zonas de inibição são medidos (mm) e comparados com medidas internacionalmente aceitas para determinar se o isolado é sensível, intermediário ou resistente aos antibióticos testados (QUINN et al., 1994).

Quando menos de três antimicrobianos são sensíveis para um determinado organismo, o teste é refeito, testando pelo menos cinco novos antibióticos, até que ocorra o número mínimo de antimicrobianos sensíveis. Em casos específicos, pode-se liberar laudos parciais mesmo que haja menos de três antibióticos sensíveis, enviando o laudo completo assim que ele for concluído.



Figura 38: Antibiograma em placa de Muller Hinton®, evidenciando-se os halos de inibição. Fonte: FONSECA, I. C. F., 2015.

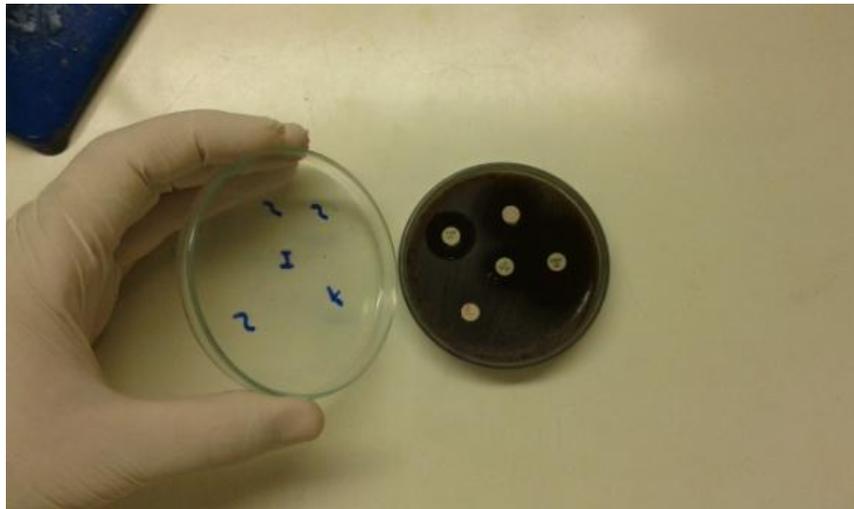


Figura 39: Antibiograma em placa de Muller Hinton Sangue®, para testar a resistência a antimicrobianos de microrganismos exigentes. Fonte: FONSECA, I. C. F., 2015.

9. ROTINA LABORATORIAL

A rotina laboratorial abrange diversas tarefas, desde o recebimento, cultura e identificação dos microrganismos até a produção de antibiogramas, laudos, descarte de resíduos contaminados, lavagem de vidraria, preparação de meios, lavagem do laboratório, acompanhamento de aulas práticas, dentre outros.

9.1 INOCULAÇÃO E INCUBAÇÃO DE AMOSTRAS BACTERIANAS

A rotina laboratorial baseia-se no acolhimento de amostras, se distinguindo em análises bacteriológicas e fúngicas. Essas amostras devem estar acompanhadas da ficha de identificação devidamente preenchida com os dados do paciente em que ela foi coletada. Na ficha de identificação do animal deve estar a suspeita do agente etiológico causador da doença, proporcionando uma metodologia diagnóstica mais eficiente, resultando em um diagnóstico mais rápido e com maior otimização do uso dos materiais e meios do laboratório, além de alertar a equipe e quem estiver manuseando o material sobre o possível grau de patogenicidade do microrganismo em questão, tomando as devidas medidas de segurança e, assim, evitando acidentes. Essa ficha de identificação é anexada à ata de atividades laboratoriais em que são transcritos todos os procedimentos realizados para obtenção do diagnóstico. No momento da recepção do material biológico este deve estar acondicionado em frasco individualizado, estéril, identificado e em alguns casos refrigerado. As amostras que não atendam às condições de acondicionamento são devolvidas ao portador ou descartadas (POP-04_00).

As amostras em swab são inoculadas em meios de plaqueamento de acordo com a exigência do microrganismo de suspeita clínica, e incubadas em estufa a 37 °C. O swab é posteriormente armazenado em geladeira. Caso não haja suspeita clínica, ele é inoculado em meio não seletivo. Se não houver crescimento nas primeiras 72 horas, o material é recuperado da geladeira, inoculado em Caldo Tiogliconato® e incubado novamente. Observa-se o crescimento no caldo e infere-se o metabolismo energético do organismo, inoculando-o em ambiente favorável para o crescimento (aerofilia, microaerofilia ou anaerofilia). Assim que houver crescimento, os swabs são descartados. Não havendo crescimento algum nas primeiras 72 horas, o material é descartado e diagnostica-se ausência de crescimento.

As amostras sólidas, como crostas, são maceradas antes de serem inoculadas em meio sólido e incubadas a 37 °C em estufa, esperando até 72 horas para se observar crescimento, caso contrário, coloca-se esse material em meio microaerófilo por mais 48 horas, caso ainda não ocorra nenhum crescimento, a amostra é descartada.

Já os materiais de biópsias e fragmentos oriundos de necropsia são coletados por meio de swab estéril e plaqueados em meio específico de acordo com a suspeita clínica. No caso dos fragmentos de necropsia, uma incisão é previamente feita no material, com o auxílio de uma lâmina de bisturi estéril, coletando o material do interior da amostra. As placas já inoculadas são incubadas a 37 °C em estufa por até 72 horas. Se não houver

crescimento o material é incubado em microaerofilia por mais 48 horas. Não existindo crescimento o meio é descartado.

As amostras de sangue e leite devem ser incubadas em *overnight* na estufa a 37 °C e inoculadas na placa de Ágar Sangue®, depositando-se uma gota e estriando-a com a alça bacteriológica. Também pode-se inocular em meios líquidos e semi sólidos como Caldo BHI® e Tiogliconato® respectivamente, incubando-os a 37 °C por até 72 horas. Caso não haja crescimento em nenhum meio o material é descartado.

Os materiais oriundos da bexiga e vesícula biliar, assim como outras amostras líquidas, devem ser inoculados em meios de plaqueamento, assim como em Caldo BHI® e Tiogliconato®, colocando-se uma gota nos meios sólidos, seguido da estriagem por meio de uma alça bacteriológica previamente flambada, e derramando de três a cinco gotas nos meios líquidos e semi sólidos. Em seguida os meios são incubados em estufa a 37 °C por até 72 horas. Havendo apenas crescimento no meio ou no fundo do tubo com Tiogliconato®, o material é reinoculado a partir desse caldo em meio sólido e incubado em ambiente de microaerofilia por até mais 48 horas. Se não existir crescimento os materiais são descartados.

Os demais materiais como lavados, aspirados, fezes, raspados de pele, dentre outros, são inoculados em meios não seletivos com o auxílio de um swab ou de uma alça bacteriológica previamente esterilizada pelo calor e incubados em estufa a 37 °C por até 72 horas. Se não houver crescimento o material é incubado em microaerofilia por mais 48 horas. A ausência de crescimento após esse período resulta no descarte desse material.

Já os materiais com suspeita de micobactérias, cada amostra deve ser inoculada em dois tubos com meio de Lowenstein-Jensen®, sendo um tubo incubado a 30 °C com a tampa “frouxa” pelas primeiras duas semanas, e o outro a 37 °C, também com a tampa desrosqueada pelas primeiras duas semanas. Após as duas primeiras semanas deve-se apertar as tampas dos meios. Observa-se semanalmente e, se há algum crescimento nas primeiras semanas, verifica-se se há contaminação. Caso haja contaminação o material é descartado e deve-se preparar outra cultura se o material ainda estiver estocado ou caso ele possa ser coletado novamente. Esses materiais são incubados por até oito semanas, fazendo leituras semanais, sempre o manuseando na segurança da capela de fluxo laminar, vestindo luvas e máscaras (ANVISA, 2004)

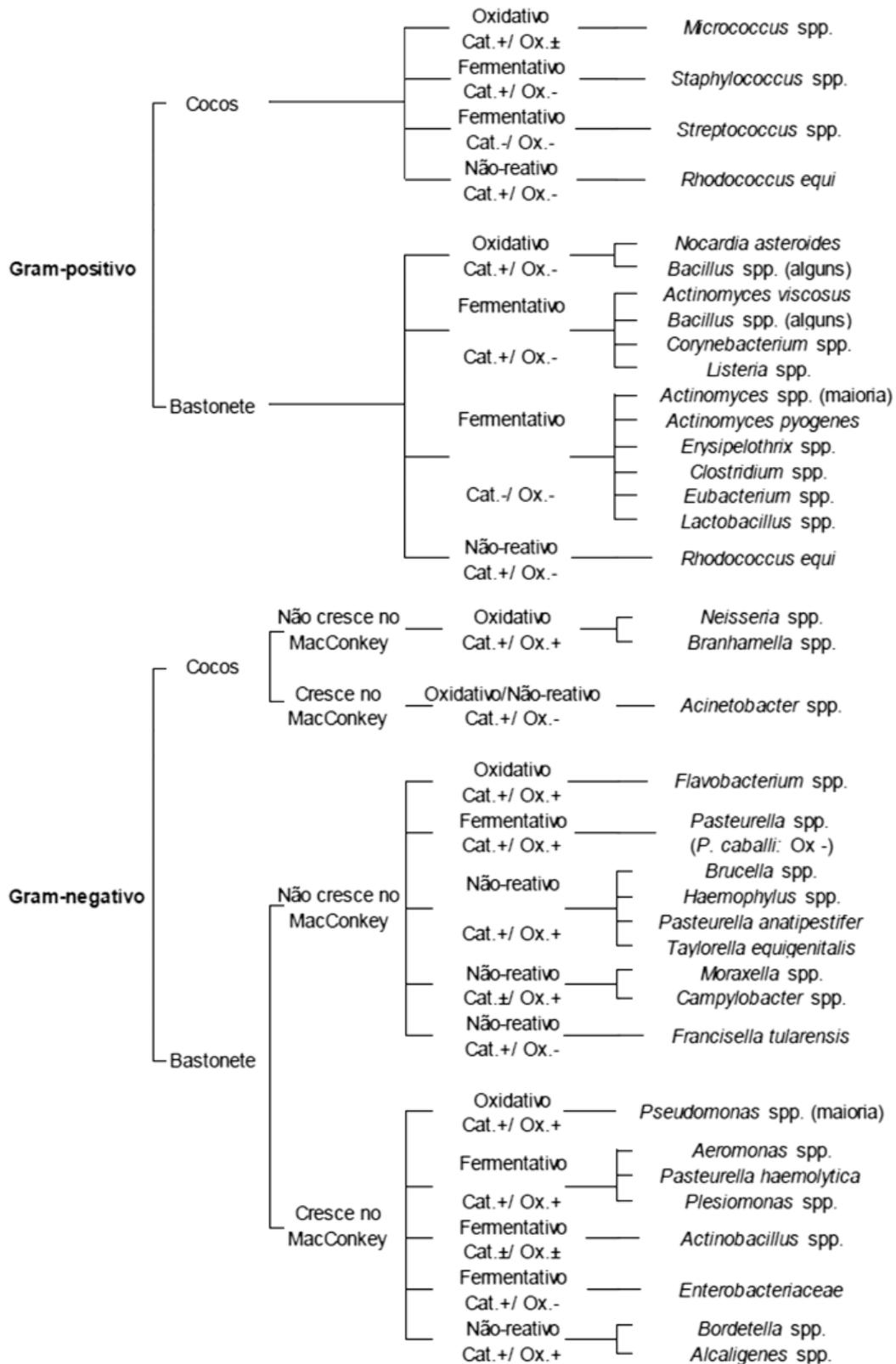
Amostras suspeitas de infecções por bactérias anaeróbias devem ser incubadas dentro da jarra de anaerobiose. *Actinomyces bovis*, *Campylobacter mucosalis* e espécies de clostrídios, fusobactérias e bacterióides são incubadas assim. No entanto, as amostras suspeitas de bactérias microaerófilas, por sua vez, são incubadas na jarra de

microaerofilia, que proporciona uma atmosfera com 5% a 10% de CO₂. *Campylobacter jejuni*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinomices viscosus* e *Brucella* spp. são considerados microaerófilos (QUINN et al., 1994).

9.2 IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS

Após completada a cultura das colônias no meio de plaqueamento, observa-se as características macroscópicas delas, assim como sua ação no meio, seu odor, sua origem, podendo-se fazer a identificação preliminar das bactérias (KONEMAN et al, 2001).

Em seguida é feito o método de coloração de Gram. Na coloração de Gram é possível determinar se as bactérias em questão tem a forma de cocos, bastonetes ou ambos. Na microscopia, é possível diferenciar até mesmo uma levedura, devido ao seu tamanho. Dessa forma, pode-se inferir o Gram de diferentes bactérias. Caso esse microrganismo seja realmente uma bactéria, para confirmar o gram faz-se o teste de KOH 3%, apontando com maior segurança se ela é Gram-positiva ou Gram-negativa. Também são feitos os testes de Hugh e Leifson (meio O-F®) e o teste da catalase para todos os microrganismos, sendo esses, os principais métodos de triagem usados no laboratório, seguindo os testes específicos para a identificação de cada suspeita. A figura 39 apresenta os testes iniciais para uma primeira identificação de forma genérica.



Fonte: QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. Clinical Veterinary Microbiology. Dublin: Wolfe, 1994, 648p.

Figura 40: Chave de identificação adaptada. Fonte: QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. Clinical Veterinary Microbiology. Dublin: Wolfe, 1994, 648p.

Caso o organismo em questão seja uma bactéria gram negativa, faz-se o teste da oxidase® e uma colônia pura é inoculada em Ágar MacConkey®. Se, além de ser gram negativa, a bactéria também for um bastonete, ela deve ser inoculada, além do Ágar McConkey®, em Ágar EMB®, Ágar TSI®, Ágar Fenilalanina®, Ágar Base Ureia®, Ágar Citrato de Simmons®, meio de cultivo água peptonada® – para o teste do Indol – e em meio de Clark Lubs® (Caldo VM/VP®), para a triagem de possíveis bactérias da família Enterobacteriaceae, resultando em diagnósticos mais rápidos.

Outras características de culturas de bastonetes gram negativos podem implicar em outros testes, como o crescimento em nuvem na placa, sendo a principal suspeita de *Proteus* spp, inoculando-o em Ágar CLED® para inibir essa mobilidade. Também em culturas com odor de uvas adocicado, presume-se que seja uma *Pseudomonas aeruginosa*, por exemplo, inoculando-a em Ágar Cetrimida® e observando se há a produção de pigmentos.

9.2.1 DIFERENCIAÇÃO DE *STAPHYLOCOCCUS* SPP

Se o microrganismo isolado for identificado como *Staphylococcus* spp, pode-se fazer testes complementares, para definir a sua espécie e até mesmo subespécie e/ou subtipo. Os testes complementares incluem o teste da coagulase livre, fator de aglutinação, malonato, crescimento anaeróbio em Caldo Tiogliconato®, resistência à bacitracina e/ou polimixina B, produção de acetoína, redução de nitratos, dentre outros.

Assim, visto que quase 40% dos microrganismos isolados foram do gênero *Staphylococcus* (gráfico 3) e a maioria dos materiais coletados para análise laboratorial foram oriundas de cães (gráfico 4), é importante ressaltar que nem todos os estafilococos são biotipos de cães. Isso ocorre pelo fato desses microrganismos, que coagulam em plasma comercial de coelho, não coagularem em plasma canino (ADESYIUN & SHEHU, 1985). Além disso, segundo LIVE (1985), os estafilococos caninos só coagulam em plasma de cães.

Portanto, é de interesse do laboratório que se utilize tanto plasma de coelho, quanto o plasma de cão na rotina para exames de diferenciação entre espécies do gênero *Staphylococcus*, oriundos de amostras caninas, para determinar a patogenicidade dos estafilococos em cães, resultando em um diagnóstico laboratorial mais acurado e refinado.

A tabela 3 demonstra os testes feitos para a diferenciação das espécies de maior relevância em medicina veterinária.

Tabela 3 - Tabela de diferenciação das espécies de importância veterinária do gênero *Staphylococcus*.

	Coagulase*	Fator de aglutinação	Cresc. anaeróbio em Tiogliconato®	Teste VP®	Arginina dihidrolase	Ornitina descarboxilase	Redução de nitratos	Urease	Bacitracina	Polimixina B	Maltose	Manitol	Manose	Treose	Sacarose	Frutose	Hemólise
<i>S. aureus</i> subesp. <i>aureus</i>	+	+	+	+	+	-	+	V	S	R	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i> subesp. <i>anaerobius</i>	+	-	+	-	ND	ND	-	ND	ND	ND	+	ND	-	+	+	+	+
<i>S. intermedius</i>	+	V	+	-	V	-	+	+	S	S	V	V	+	+	+	+	+
<i>S. schleiferi</i> spp. <i>schleiferi</i>	-	+	+	+	+	-	+	-	S	S	-	-	+	V	-	+	+
<i>S. schleiferi</i> spp. <i>coagulans</i>	+	-	+	+	+	-	+	ND	ND	ND	-	V	V	-	V	ND	+
<i>S. delphini</i>	+	-	+	-	ND	ND	+	+	ND	ND	+	+	+	-	+	+	+
<i>S.</i> <i>pseudintermedius</i>	+	-	ND	+	ND	ND	+	ND	ND	S	+	-	ND	ND	+	ND	+
<i>S. hycus</i>	V	-	+	-	+	-	+	V	R	R	-	-	+	+	+	+	-
<i>S. lutrae</i>	+	-	ND	-	ND	ND	+	ND	ND	S	+	+	ND	ND	ND	ND	+
<i>S. chromagenes</i>	-	-	+	V	+	-	+	+	R	R	V	V	+	+	+	+	-
<i>S. xylosus</i>	-	-	+	V	-	-	V	+	V	S	+	+	+	+	+	+	N D
<i>S. epidermidis</i>	-	-	+	+	V	V	+	+	S	R	+	-	+	-	+	+	V
<i>S. cohnii</i> spp. <i>cohnii</i>	-	-	V	V	-	-	-	-	V	S	V	V	V	+	-	+	N D

	Coagulase*	Fator de aglutinação	Cresc. anaeróbio em Tiogliconato®	Teste VP®	Arginina diidrolase	Ornitina descarboxilase	Redução de nitratos	Urease	Bacitracina	Polimixina B	Maltose	Manitol	Manose	Trealose	Sacarose	Frutose	Hemólise
<i>S. cohnii</i> spp. <i>urealyticum</i>	-	-	+	V	-	-	-	+	ND	ND	+	+	+	+	-	+	ND
<i>S. galinarium</i>	-	-	+	-	-	-	+	+	S	S	+	+	+	+	+	+	V
<i>S. lentus</i>	-	-	+	-	-	-	+	-	S	S	V	+	V	+	+	+	-
<i>S. equorum</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	ND	ND	V	+	+	+	+	+	V
<i>S. haemolyticus</i>	-	-	+	+	+	-	+	-	R	S	+	V	-	+	+	V	ND
<i>S. warneri</i>	-	-	+	+	V	-	V	+	S	S	+	V	-	+	+	+	ND
<i>S. felii</i>	-	-	+	-	+	ND	+	+	ND	ND	-	+	+	V	-	+	ND
<i>S. auricularis</i>	-	-	+	-	V	-	V	-	V	S	+	-	-	+	V	+	ND
<i>S. capitis</i> spp. <i>capitis</i>	-	-	+	V	V	-	V	-	S	S	-	+	+	-	+	+	ND
<i>S. capitis</i> spp. <i>ureolyticus</i>	-	-	+	V	+	-	+	+	ND	ND	+	+	+	-	+	+	ND
<i>S. caprae</i>	-	-	+	+	+	-	+	+	S	S	V	V	+	+	+	+	V
<i>S. hominis</i>	-	-	-	V	V	-	V	+	S	S	+	-	-	V	+	+	ND
<i>S. muscae</i>	-	-	+	-	-	-	+	-	ND	ND	-	-	-	+	+	ND	ND
<i>S. pasteurii</i>	-	-	+	V	V	-	V	+	ND	ND	V	V	-	+	+	ND	ND
<i>S. simulans</i>	-	-	+	V	+	-	+	+	S	S	+	+	V	V	+	+	V

* Plasma de coelho; ND - Não definido. **Fonte: Acervo pessoal.**

9.3 INOCULAÇÃO E INCUBAÇÃO DE AMOSTRAS FÚNGICAS E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS

A maioria das amostras de fungos, que são recebidas acondicionadas individualmente em recipientes estéreis, são inoculadas em Ágar Sabouraud® próximas à chama do bico de Bunsen e incubadas em temperatura ambiente na caixa fúngica por 15 dias. Caso não haja crescimento nos primeiros 15 dias, espera-se mais 7 dias para uma segunda leitura. Se a ausência de crescimento persistir, o material é descartado. Já as amostras de pele e/ou pêlo com suspeitas de dermatofitoses são inoculadas em Ágar Mycosel®.

A identificação das colônias é feita pelo exame das suas características macroscópicas, como sua coloração, o seu relevo e seu aspecto físico (aveludado, liso, etc.), sendo necessária a observação posterior em microscopia óptica em aumento de 400x, utilizando o método da fita adesiva com o corante azul de metileno, para visualizar as estruturas fúngicas microscópicas que diferem em cada gênero e espécie, como as hifas, septos, esporangiosporos, conidóforos, conídios, fiálides, dentre outros.

Já aquelas amostras que foram inoculadas em Mycosel® são incubadas à temperatura ambiente na caixa fúngica e podem ser examinadas após quinze a vinte e um dias. Faz-se, primeiramente, a observação das características macroscópicas das colônias. Fungos dermatófitos, em geral, produzem hifas delgadas e com aspecto de teia de aranha ou cabelos entrelaçados. O diagnóstico é confirmado com a visualização de macroconídeos na microscopia óptica no aumento de 400x.

Swabs otológicos com suspeitas de leveduras são inoculados em placas de ágar Sabouraud® e estas são incubadas na estufa de cultivo microbiológico por até sete dias. O diagnóstico é confirmado com a análise da lâmina corada com coloração de Gram no microscópio óptico no aumento de 1000x.

É importante lembrar que as análises de colônias fúngicas devem ser feitas, de preferência, após todos os outros procedimentos laboratoriais terem terminado, estando todos os outros meio e placas de cultura guardados ou incubados. Isso é necessário devido à grande produção de esporos por algumas espécies fúngicas, podendo contaminar os outros meios e culturas. Após a examinação desses fungos, deve-se lavar as bancadas com álcool 70%, para garantir a descontaminação do laboratório.

9.4 ROTINA DE PREPARO DE MEIOS E SOLUÇÕES

As bases para a confecção dos meios sólidos, semi sólidos e líquidos são armazenadas no armário que se encontra na sala de meios, identificadas, numeradas e organizadas em ordem numeral para serem facilmente encontradas e 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, aquecidos em forno micro-ondas, e homogeneizados por bastões de vidro ou por meio de uma bailarina associado à um agitador magnético. Esse procedimento deve ser feito com o uso de máscara protetora, devido ao potencial cancerígeno dos substratos liberados pelo aquecimento do ágar, que ficam dispersos pelo ar. Os meios homogeneizados são então vedados e levados à autoclave por 15 minutos a 121°C. No caso de soluções semi sólidas e líquidas, as soluções são preparadas 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 descrito anteriormente.

Em alguns casos, faz-se a adição posterior de algum aditivo, como a glicose, uréia e o sangue, que não podem passar pelo ciclo da autoclave devido a desnaturação de suas proteínas e perda de suas características nutricionais, sendo essa adição e distribuição dos meios feita na capela de fluxo laminar para garantir meios não contaminados.

Já as soluções para o preparo de reagentes e corantes ficam dispostas nas prateleiras dessa sala ou nas geladeiras de material não contaminado do setor de bacteriologia e micologia. O preparo desses líquidos é feito sobre a pia, utilizando-se máscaras, luvas, tocas e óculos protetores, a fim de evitar o contato com as substâncias tóxicas e cancerígenas que compõem tais soluções.

Todos os meios e soluções, antes de serem autoclavados, devem ter seu pH aferido por meio do pHmetro, garantindo um controle de qualidade deles e dos diagnósticos laboratoriais.

Os meios são preparados pelos técnicos, residentes e estagiários do laboratório, organizando o seu preparo, normalmente em duplas, por meio de escalas, garantindo que todos participem desse importante processo.

Em algumas quartas feiras há uma maior produção de meios, devido à ocorrência de aula prática nas quintas feiras pela manhã.

9.5 ROTINA DE DESCARTE DE RESÍDUOS E LAVAGEM DO LABORATÓRIO

Os materiais contaminados não perfurocortantes, que possuem risco biológico, são separados do lixo comum, por meio do descarte em saco de lixo branco e preto, respectivamente. O lixo branco é encaminhado para ser autoclavado enquanto que o lixo preto é normalmente descartado.

Os perfurocortantes são primeiramente armazenados em Descarpack®, devidamente identificada como biologicamente perigosa, localizada em baixo das bancadas de trabalho do setor de bacteriologia e micologia, enquanto que as lâminas são descartadas em uma caixa de plástico, ao lado da pia nesse mesmo setor. Periodicamente, esses materiais são encaminhados à um receptáculo de plástico, encontrado no setor de descarte de resíduos e esterilização de materiais. Quando esse receptáculo encontra-se cheio, os materiais recebidos são transferidos para múltiplas camadas de sacos plásticos brancos, formando uma parede espessa e resistente, sendo enviada para o processo de autoclavagem.

A esterilização, limpeza e higiene das vidrarias e tampas se dá, primeiramente, na autoclavagem de todo o material sujo e contaminado usado na rotina do laboratório. Em seguida, os materiais descartáveis, que foram colocados em um saco de lixo branco para serem autoclavados, são descartados. Depois faz-se uma primeira lavagem retirando a maior parte dos resíduos, seguida da imersão dessa vidraria em uma mistura desengrudente por pelo menos 24 horas.

Ao término desse período faz-se uma nova lavagem para limpar os resíduos do desengrudente seguida de enxágue com água destilada. Por fim, todas as vidrarias, assim como as tampas, são colocadas para secar em uma estufa com temperatura de 60 C, localizada na sala de meios.

Após secas, as placas de petri e as pipetas de vidro são embalados em papelão e fita autoclave, sendo autoclavados por 15 minutos a 121 °C e estocados nas gavetas do laboratório, prontas para serem reutilizadas.

Já o laboratório é lavado, por uma equipe terceirizada, todas as quartas feiras, no período de 12 horas até as 14 horas, além de recolher os lixos do laboratório e fazer a troca desses sacos de lixo, mantendo, assim, o laboratório limpo. Ao final de cada dia, todas as bancadas devem ser limpas com álcool 70%.

10. CASUÍSTICA

10.1 Levantamento de casos bacteriológicos

Em um período de 63 dias úteis, desconsiderando os feriados e pontos facultativos, relativos do dia 08 de março ao 10 de junho, completando assim 504 horas de estágio obrigatório supervisionado, foram recebidas no laboratório 240 amostras para análise bacteriológica tais como swabs de ouvido, urina, biópsias, efusões pleurais, peritoneais e torácicas, raspados e swabs de pele, swabs de globo ocular e lágrima, lavados traqueais, aspirado de abscessos, sangue venoso, swabs nasais, líquido, dentre outros. Dessas 240 amostras, as que foram recebidas com maior frequência no laboratório foram as de urina e swabs de ouvido, representando aproximadamente 32,9% e 29,6%, respectivamente. Essas duas amostras juntas correspondem cerca de 62,5% de todas as amostras processadas.

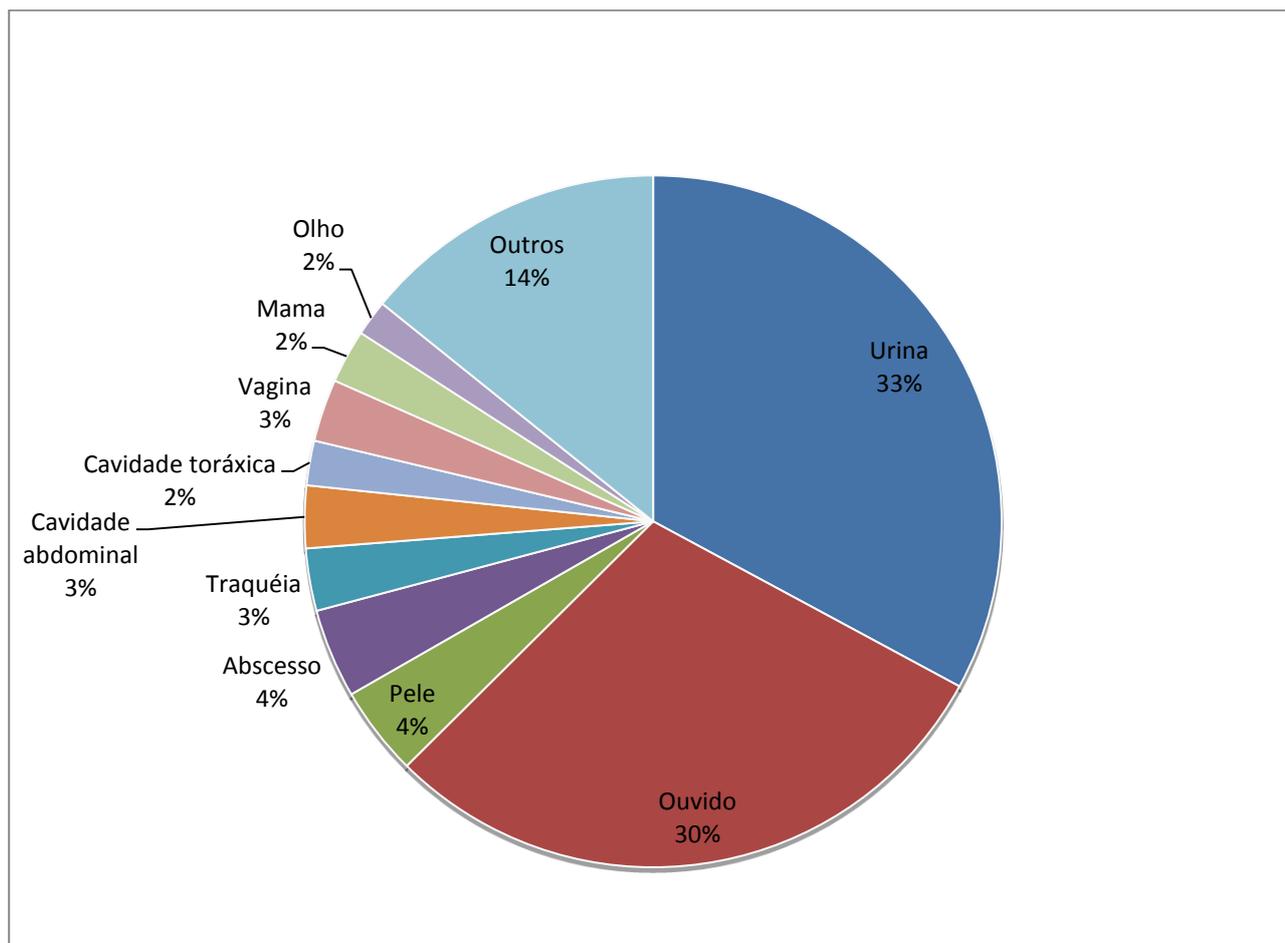


Gráfico 1 – Levantamento dos materiais coletados das amostras bacteriológicas recebidas de março a junho de 2016. Fonte: Acervo pessoal.

Dessas amostras, 196 foram recebidas do Hospital veterinário de pequenos animais (Hvetinho); 15 do Laboratório de Patologia Veterinária da UnB (LPV); 7 de veterinários e clínicas particulares (Externo); 6 do Instituto Federal de Brasília (IFB); 6 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA); 3 da Central de Abastecimento (CEASA); 3 do Hospital Veterinário de Grandes Animais da UnB (Hvetão); 1 do Jardim Zoológico de Brasília (Zoo); 1 da Granja do Torto; 1 do Batalhão da Guarda Presidencial do Exército Brasileiro (BGP) e 1 da Secretaria de Estado de Agricultura, Abastecimento e Desenvolvimento Rural (SEAGRI).

A maioria das amostras foram recebidas do Hvetinho, representando cerca de 81,7% do total de amostras acolhidas.

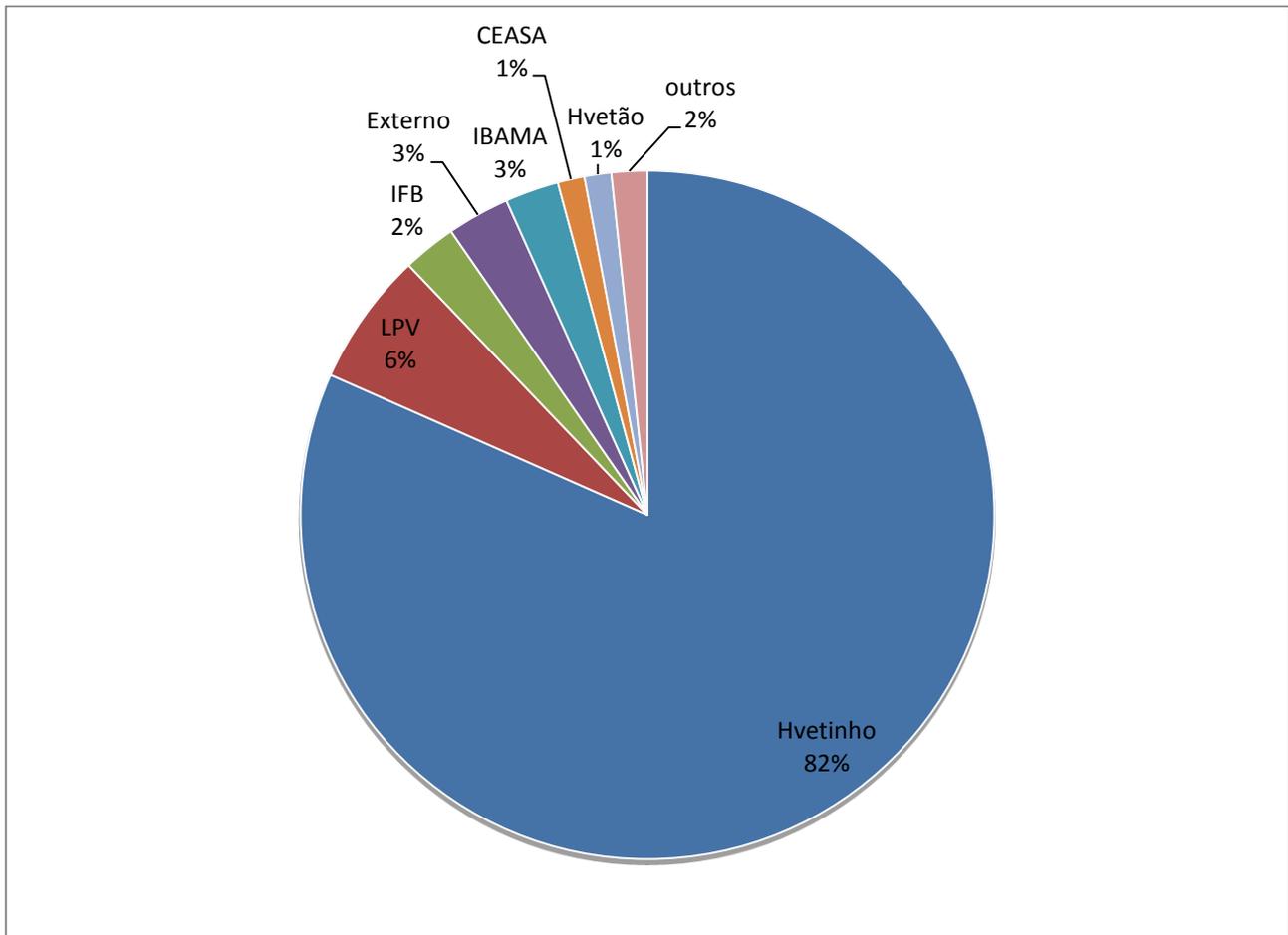


Gráfico 2 – Levantamento dos locais de onde foram coletadas as amostras bacteriológicas recebidas de março a junho de 2016. Fonte: Acervo pessoal

As amostras recebidas foram coletadas de diferentes espécies animais. Dessas coletas, 162 vieram de animais identificados como caninos (*Canis lupus familiaris*); 34 de felinos (*Felis catus*); 6 de bovinos (*Bos taurus*); 6 de ovinos (*Ovis aries*); 4 de caprinos (*Capra aegagrus hircus*); 4 de cervos dama (*Dama dama*); 4 de tilápias (*Oreochromis niloticus*); 3 de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*); 3 de papagaios verdadeiros (*Amazona aestiva*); 2 de calopsitas (*Nymphicus hollandicus*); 2 de equinos; 2 de lagomorfos; 1 de sabiá-da-mata (*Turdus fumigatus*); 1 de aratinga-de-bando (*Psittacara leucophthalmus*); 1 de maritaca (*Pionus maximiliani*); 1 de jabuti (*Chelonoidis carbonaria*); 1 de pirapitinga (*Piaractus brachypomus*); 1 de tambaqui (*Colossoma macropomum*); 1 de galinha (*Gallus gallus*) e 1 de roedor.

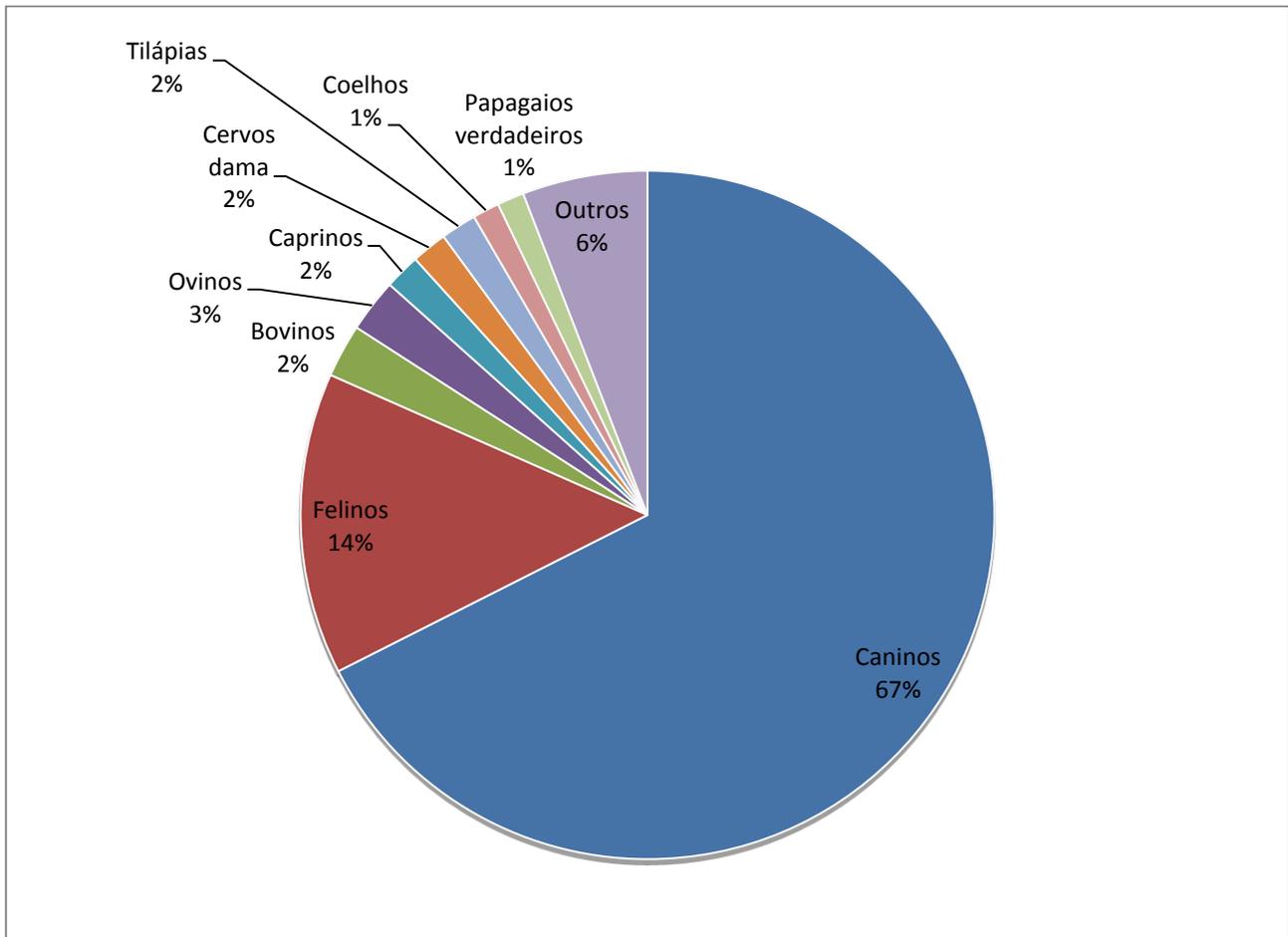


Gráfico 3 – Levantamento das espécies das quais foram coletadas as amostras bacteriológicas de março a junho de 2016. Fonte: Acervo pessoal

Do total de 240 amostras recebidas, foram isoladas e identificadas 240 bactérias. Dessas amostras, 75 tiveram ausência de crescimento, 5 ainda estavam sendo processadas e 2 obtiveram um diagnóstico inconclusivo. Das 240 bactérias isoladas, foram identificados 125 *Staphylococcus* spp; 31 *Escherichia coli*; 27 *Bacillus* spp, sendo dois deles identificados como *Bacillus cereus*; 14 *Proteus* spp, sendo 8 *P. mirabilis* e 2 *P. vulgaris*; 9 *Enterobacter* spp, sendo 7 *E. agglomerans* e 1 *E. cloacae*; 7 *Streptococcus* spp; 7 *Pasteurella* spp, sendo 1 *P. aerogenes* e 1 *P. ureae*; 5 do gênero *Klebsiella*, sendo 4 *K. pneumoniae* e 1 *K. oxytoca*; 4 *Pseudomonas* spp, sendo uma delas *P. aeruginosa*; 2 *Serratia liquefaciens*; 2 *Corynebacterium* spp; 1 *Rhodococcus equi*; 1 *Listeria* spp; 1 *Enterococcus* spp; 1 *Salmonella* spp; 1 *Campylobacter* spp; 1 *Actinomyces* spp e 1 *Sarcina* spp.

Os números de amostras bacterianas e bactérias isoladas foi coincidentemente o mesmo, tendo em vista que enquanto algumas amostras não apresentaram o crescimento de nenhum microrganismo, outras tiveram a cultura de cinco organismos diferentes.

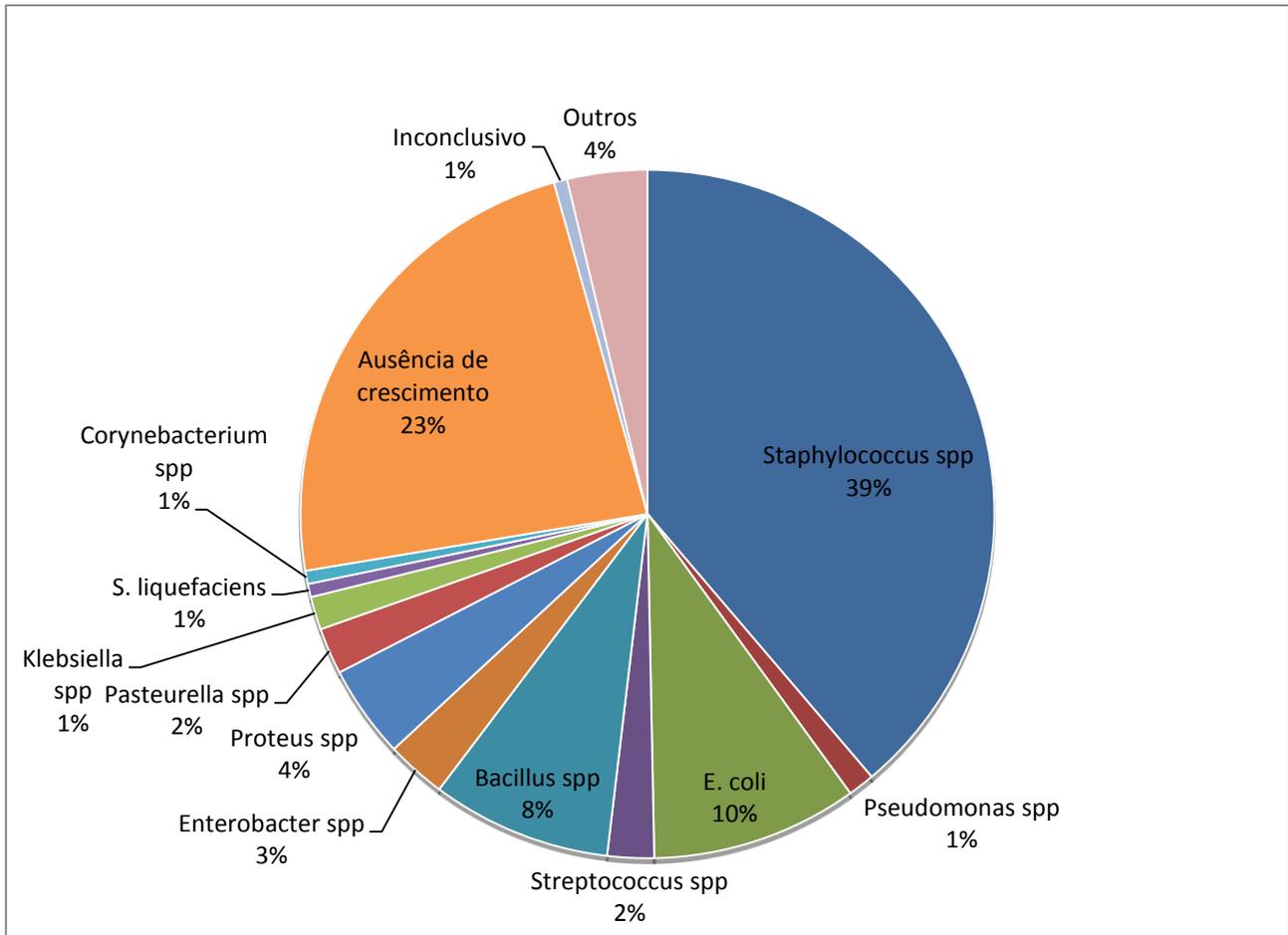


Gráfico 4 – Resultados dos exames bacteriológicos de março a junho de 2016.

Fonte: Acervo pessoal.

10.1.1 DESCRIÇÃO DOS DIAGNÓSTICOS BACTERIOLÓGICOS MAIS FREQUENTES

Os diagnósticos bacteriológicos mais frequentes foram, respectivamente, *Staphylococcus* spp (39%), ausência de crescimento (23%), *Escherichia coli* (10), *Bacillus* spp (8%), *Proteus* spp (4%) e *Enterobacter* spp (3%). As características desses diagnósticos estão descritos na tabela 4.

Tabela 4 - Características dos diagnósticos bacteriológicos feitos no Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária do período de março a junho de 2016.

<i>Staphylococcus spp</i>	Os estafilococos são cocos Gram-positivos, com aproximadamente 1 μm de diâmetro e que tendem a formar agrupamentos em cachos de uva. A maioria dos estafilococos é anaeróbia facultativa e catalase positiva. São imóveis, oxidase negativa e não formam esporos (QUINN et al, 2005)
Ausência de crescimento	As ausências de crescimento ocorrem por vários motivos. Os principais são: falhas durante a coleta de materiais, erros de inoculação ou de armazenamento das amostras, coleta de animais que estão sendo tratados com antimicrobianos, falhas no preparo de meios e erros na incubação.
<i>Escherichia coli</i>	Geralmente móvel, com flagelos peritríquios e frequentemente fimbriada. São fermentadoras de lactose e algumas linhagens produzem colônias com brilho metálico quando crescem em Ágar EMB®. Muitas linhagens de <i>E. coli</i> são de baixa virulência, mas podem causar infecções oportunistas em localização extra-intestinal (QUINN et al, 2005).
<i>Bacillus spp</i>	A maioria das espécies desse gênero são compostas de grandes bastonetes Gram-positivos, produtores de esporos, com até 10 μm de comprimento. Poucas espécies não patogênicas são Gram-negativas. Elas são catalase positivas, anaeróbias facultativas ou aeróbias e, com exceção de <i>B. anthracis</i> e <i>B. mycoides</i> , móveis (QUINN et al, 2005).
<i>Proteus spp</i>	São enterobactérias, bastonetes Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos. São móveis com flagelos peritríquios. Ocorrem principalmente em casos de cistite e distúrbios gastrointestinais, bem como otites (OLIVEIRA, 2000).
<i>Enterobacter spp</i>	São bastonetes Gram-negativos, em forma de bastonetes, catalase positivos, oxidase negativos e crescem bem em meio MacConkey®. Utilizam açúcares para a fermentação (OLIVEIRA, 2000)

Fonte: Acervo pessoal.

10.2 LEVANTAMENTO DE CASOS MICOLÓGICOS

Durante 63 dias úteis, desconsiderando os feriados e pontos facultativos, relativos

do dia 08 de março ao 10 de junho, de estágio obrigatório supervisionado, foram acolhidas no laboratório 68 amostras para análises micológicas. Dentre elas estão materiais como pele/pêlo, swabs de ouvido, swabs de pele, aspirados torácicos, swabs de nariz, olho e mama, biópsias, materiais de necropsia, dentre outros. Dessas 68 amostras, as que foram recebidas com maior regularidade foram as coletas de pele/pêlo e os swabs de ouvido, refletindo aproximadamente 66,2% e 17,7% de todas as amostras, respectivamente.

Essas duas amostras juntas, demonstram cerca de 83,9% de todas as amostras fúngicas recebidas.

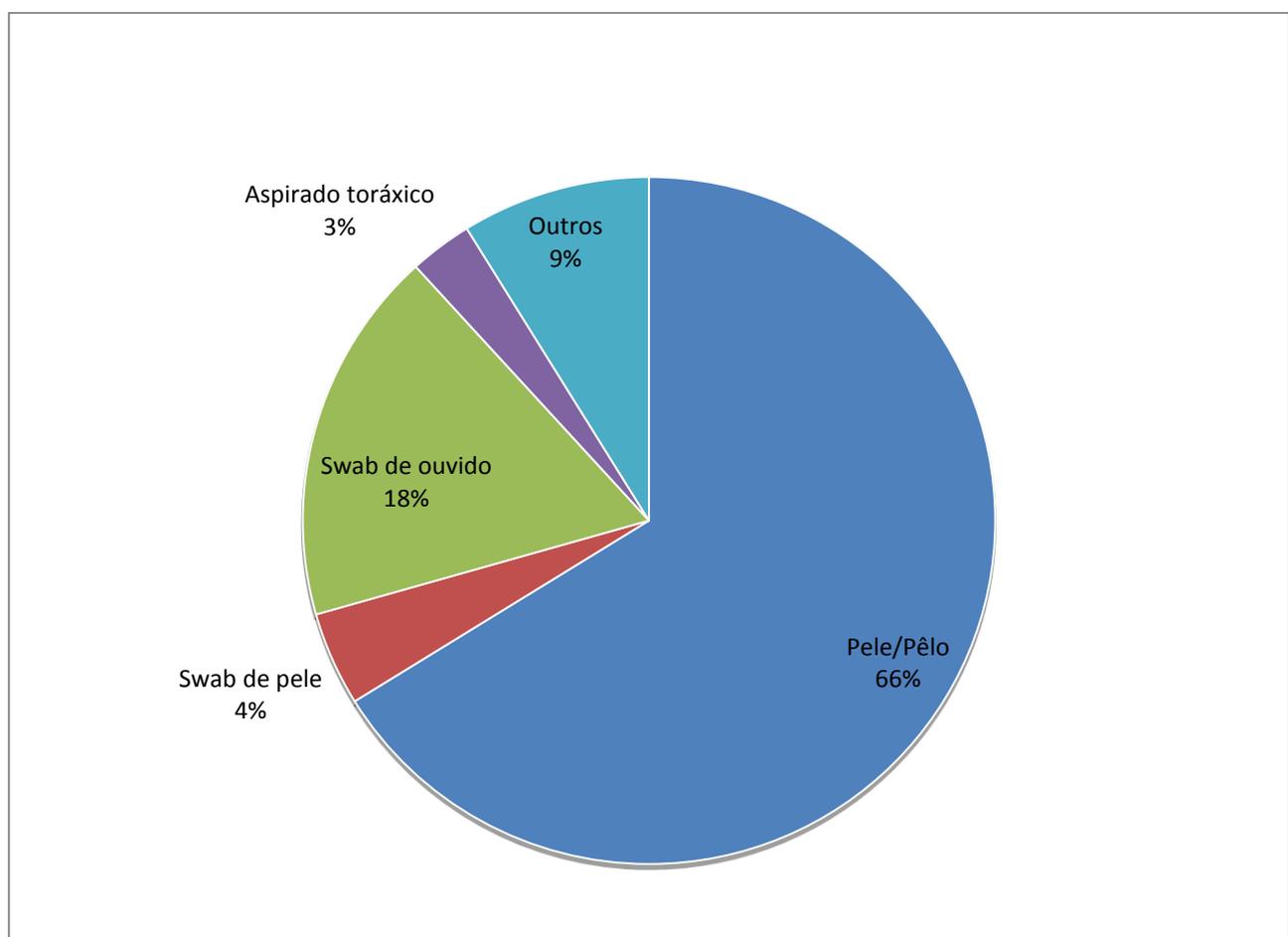


Gráfico 5 – Levantamento dos materiais coletados das amostras micológicas recebidas de março a junho de 2016. Fonte: Acervo pessoal.

Dessas amostras, 64 foram recebidas do Hospital Veterinário de Pequenos Animais da UnB (Hvetinho), 1 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), 1 do Laboratório de Patologia Veterinária da UnB (LPV), e dois de veterinários e clínicas particulares (Externo).

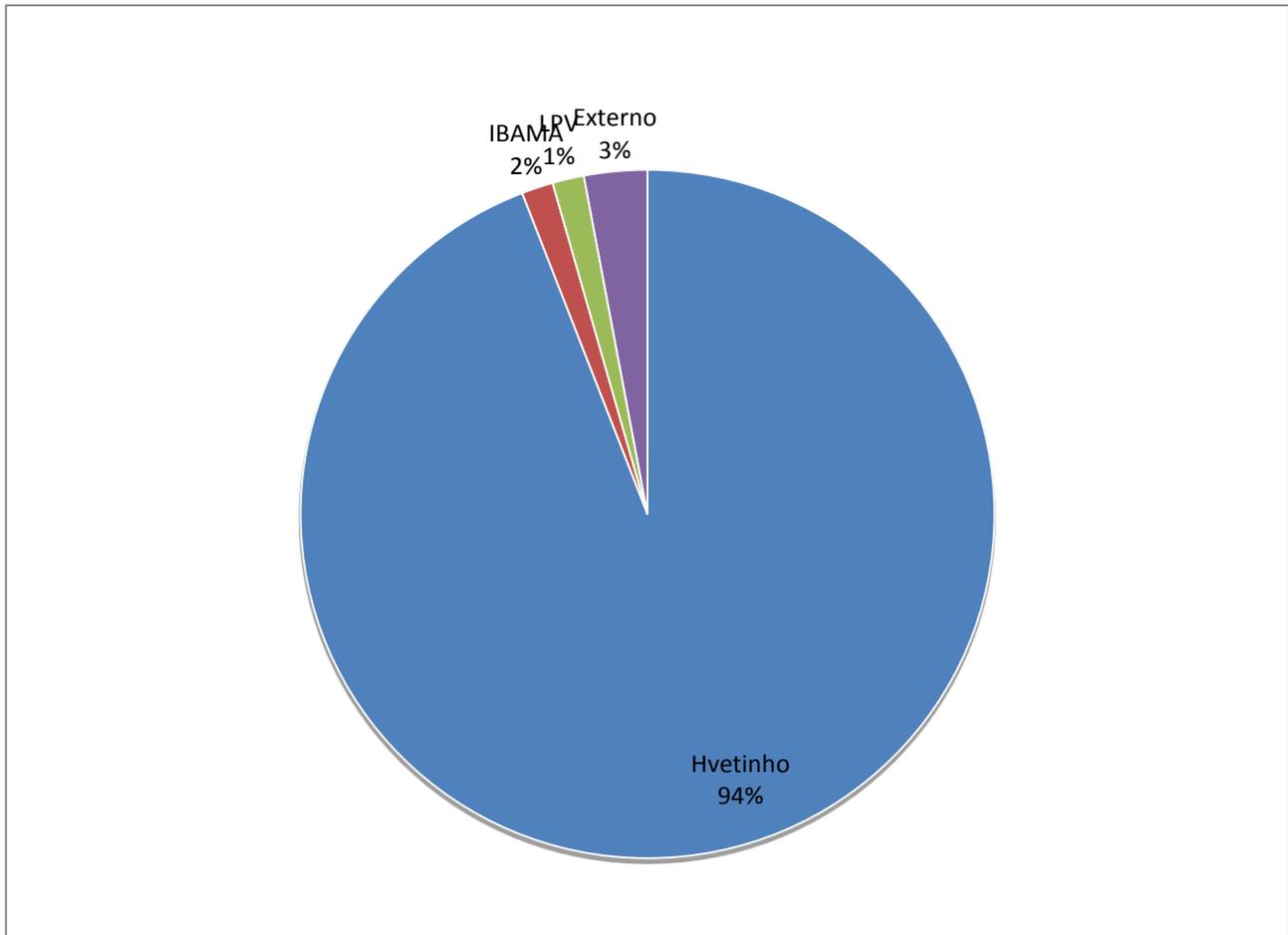


Gráfico 6 – Levantamento dos locais de onde foram coletadas as amostras micológicas recebidas de março a junho de 2016. Fonte: Acervo pessoal

As amostras acolhidas foram coletadas de espécies animais diferentes. Dessas coletas, 34 foram recolhidas de animais identificados como caninos (*Canis lupus familiaris*); 28 de felinos (*Felis catus*); 2 de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*); 2 de lagomorfos; 1 de garça-branca (*Casmerodius alba*) e 1 de jibóia (*Boa constrictor*).

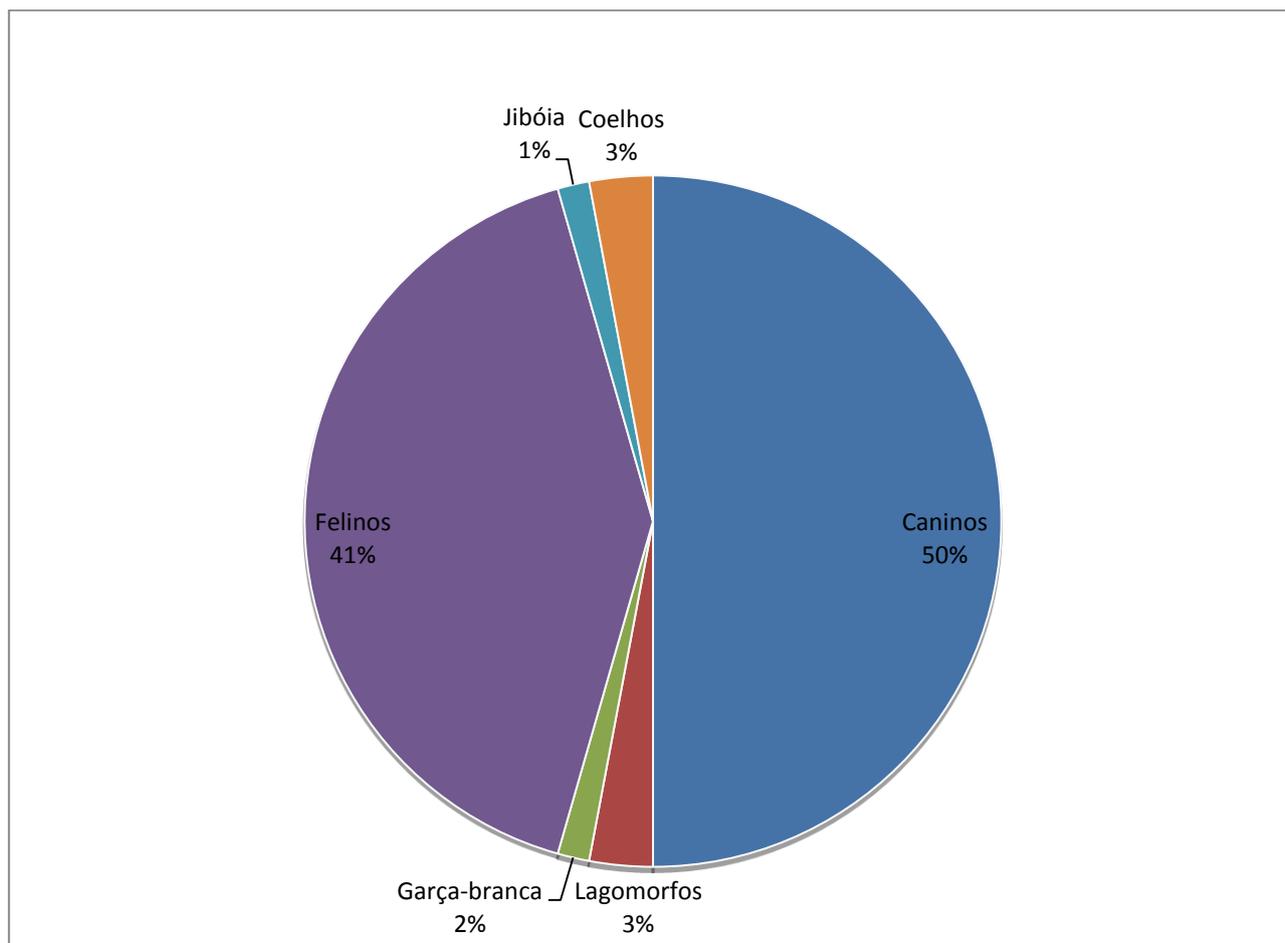


Gráfico 7 – Levantamento das espécies das quais foram coletadas as amostras micológicas de março a junho de 2016. Fonte: Acervo pessoal

Do total de 68 amostras recebidas, foram isoladas e identificadas 18 fungos. Dessas amostras, 49 eram para confirmar a suspeita clínica de infecção por fungos dermatófitos, com 46 delas diagnosticadas como ausência de crescimento de fungos dermatófitos, 1 confirmada para fungos dermatófitos, 1 para *Microsporum* spp e 1 para *Microsporum canis*. De todas as amostras fúngicas, foram isolados e identificados 6 *Curvularia* spp, 4 *Malassezia* spp, 3 leveduras, 1 *Aspergillus* spp e 1 *Aspergillus fumigatus*. Do total de amostras recebidas, 13 tiveram ausência de crescimento e 2 obtiveram um diagnóstico inconclusivo.

O número de fungos isolados e identificados, somados às ausências de crescimento geral e a de fungos dermatófitos, foi maior que o número de amostras, devido ao fato de uma única amostra originar o crescimento de mais de uma espécie de fungo. Outrossim, todas as amostras com suspeita de dermatófitos, caso não haja o crescimento desses fungos, além de serem diagnosticadas como ausência de crescimento de fungos dermatófitos, também podem ser diagnosticadas de acordo com o fungo identificado.

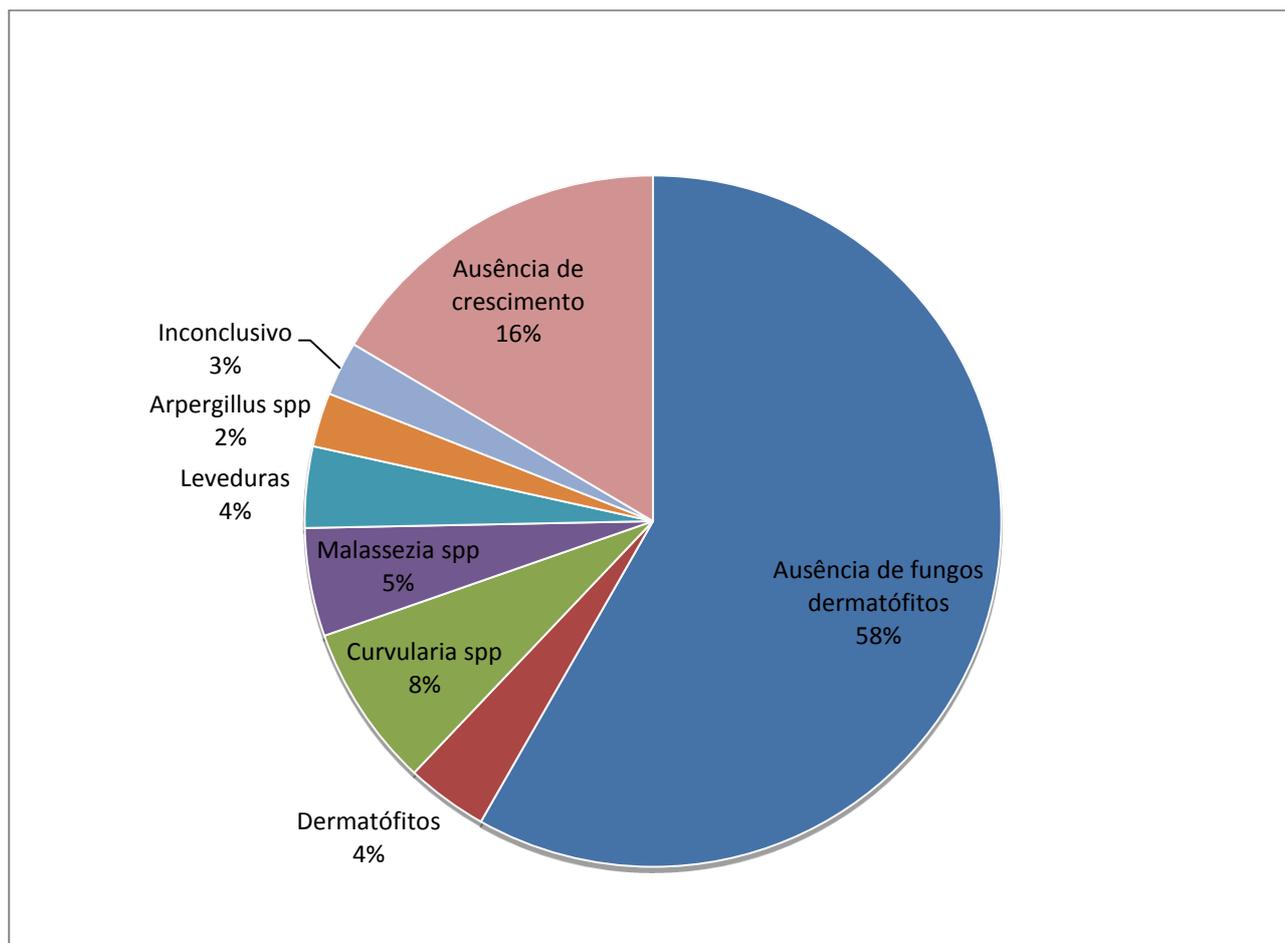


Gráfico 8 – Resultados dos exames micológicos de março a junho de 2016. Fonte: Acervo pessoal.

10.2.1 DESCRIÇÃO DOS DIAGNÓSTICOS MICOLÓGICOS MAIS FREQUENTES

Os diagnósticos micológicos mais frequentes foram, respectivamente, ausência de crescimento de fungos dermatófitos (58%), ausência de crescimento (16%), *Curvularia spp* (8%), *Malassezia spp* (5%), leveduras (4%) e fungos dermatófitos. As características desses diagnósticos estão descritos na tabela 5.

Tabela 5 - Características dos diagnósticos micológicos feitos no Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária do período de março a junho de 2016.

Ausência de crescimento de fungos dermatófitos	Quando o pedido do exame é feito para investigar a presença de fungos dermatófitos, independentemente do crescimento de outros tipos de microrganismos, o diagnóstico é descrito como ausência de crescimento de fungos dermatófitos. Também pode-se adicionar os outros microrganismos isolados ao diagnóstico laboratorial.
Ausência de crescimento	As ausências de crescimento ocorrem por vários motivos. Os principais são: falhas durante a coleta de materiais, erros de inoculação ou de armazenamento das amostras, coleta de animais que estão sendo tratados com antimicrobianos, falhas no preparo de meios e erros na incubação.
<i>Curvularia</i> spp	São fungos dematiáceos, frequentemente associados ao meio ambiente com a decomposição de matéria orgânica de origem vegetal. Podem causar feo-hifomicose cutânea, subcutânea ou sistêmica. Possuem hifas curtas, longas, ramificadas ou não, regulares ou retorcidas. Seus conídios são típicos, esféricos ou em cadeia, septados ou não (CRUZ, L. C. H., 2010)
<i>Malassezia</i> spp.	Esse gênero possui uma biologia pouco conhecida. São fungos leveduriformes, de aspecto globoso ou elipsoide, cuja reprodução assexuada se dá através de brotamento monopolar, em sua maioria. São frequentemente isolados de amostras de pele e ouvido em cães e gatos (CRUZ, L. C. H., 2010).
Leveduras	Esse diagnóstico ocorre quando apenas foi possível observar a morfologia do fungo, englobando diversos gêneros, tanto os fungos leveduriformes quanto os dimórficos, que apresentam morfologia tanto filamentosa quanto de levedura.
Fungos dermatófitos	Os dermatófitos constituem um grupo de fungos patogênicos capazes de utilizar a queratina como nutrientes, e por isso, são encontrados parasitando os tecidos queratinizados do homem e dos animais. Seu crescimento é restrito às áreas queratinizadas. Os principais gêneros causadores de doenças nos animais são o <i>Microsporum</i> e o <i>Trichophyton</i> (CRUZ, L. C. H., 2010).

.Fonte: Acervo pessoal.

11. EMISSÃO DE LAUDOS

O resultado do exame microbiológico é entregue para o proprietário ou veterinário responsável no formato de laudos, contendo as seguintes informações: nome do veterinário responsável pela coleta; identificação do animal, contendo o nome, idade, raça, sexo e RG, se o animal for paciente do Hospital Veterinário da UnB; nome do proprietário, exames solicitados, material a ser analisado, data de recebimento e entrega do laudo. Nos laudos bacteriológicos, além de dizer quais microrganismos foram isolados, também apresenta uma tabela com os resultados dos antibiogramas, caso tenha sido solicitado. Se não houver crescimento em ágar sangue® após 72 horas de incubação, e nem em meio microaerófilo após 48 horas incubado, deve-se informar no laudo a ausência de crescimento.

Nos laudos fúngicos deve-se informar qual microrganismo foi isolado e identificado, e caso não haja crescimento em até 21 dias após a inoculação, informa-se a ausência de crescimento. No caso dos exames solicitados para a investigação de fungos dermatófitos, quando não ocorre o crescimento desses fungos, é informado tanto a ausência de crescimento de fungos dermatófitos, quanto os microrganismos que foram cultivados.

O período para a entrega de laudos bacteriológicos deve ser de uma semana, desde o dia em que a amostra foi entregue. Em casos especiais, em que o paciente corre risco de vida, pode-se enviar o laudo parcial, contendo apenas o antibiograma, sem ter identificado o microrganismo. Caso o isolamento, identificação e o teste de antibiograma demorar mais que uma semana, deve-se comunicar o veterinário responsável para saber a urgência do diagnóstico, podendo então, liberar um laudo parcial.

Já os laudos micológicos têm um período de espera maior, de até 21 dias, devido ao tempo necessário para esse tipo de cultura. Em casos especiais, pode-se examinar o desenvolvimento das culturas diariamente, para enviar o diagnóstico o mais rápido possível.

12. RELATO DE EXPERIÊNCIA

Durante o período de 63 dias úteis, desconsiderando os feriados e pontos facultativos, relativos do dia 08 de março ao 10 de junho, completando 504 horas de estágio obrigatório supervisionado, no Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da UnB, foi possível estudar diversos casos, discutí-los com colegas, assistir a seminários,

praticar técnicas laboratoriais de rotina, coletar materiais tanto no Hvetinho quanto em fazendas particulares e produzir diagnósticos laboratoriais por meio de testes bioquímicos e antibiogramas, elucidando o comportamento das doenças infecciosas e sua importância para a saúde animal e pública.

Também se pôde aprender sobre o preparo e a utilidade prática de diferentes meios de cultura e semi-cultura, além de testes bioquímicos em fita ou por meio de reagentes aplicados diretamente em colônias ou em meios líquidos pré-inoculados. Da mesma forma, o conhecimento sobre tais meios foi aprofundado pela participação da equipe da Micro Médica Veterinária no concurso Ágar Arte, que consistiu na preparação artística utilizando meios de cultura, colônias de microrganismos, reagentes, dentro outros, para o preparo de desenhos em meios de plaqueamento, com o intuito de demonstrar criatividade, design e apresentação. Além disso, os trabalhos foram acompanhados de uma descrição escrita à exatidão científica, possibilitando compartilhar conhecimentos microbiológicos e explorar a beleza infecciosa de bactérias e fungos.

Não só foi permitido o aprendizado sobre microbiologia e doenças infecciosas, como também a produção de uma tabela para a diferenciação de espécies do gênero *Staphylococcus* relevantes para a medicina veterinária. Pois, tendo em vista que a grande maioria das bactérias isoladas e identificadas pertencia a esse gênero, a falta de tal tabela limitava o aprofundamento e a qualidade de boa parte dos diagnósticos laboratoriais produzidos no Laboratório de Microbiologia Veterinária da UnB.

Assim, durante o estágio obrigatório supervisionado no laboratório, foi possível tanto o aprendizado pessoal, quanto a assistência laboratorial aos residentes e técnicos, assim como produção de tabelas e de estatísticas a fim de melhorar os diagnósticos laboratoriais e elucidar as prevalências infecciosas recebidas no laboratório, respectivamente.

13. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises microbiológicas, assim como a execução dos testes bioquímicos e a coleta de materiais para análise, acompanhadas e realizadas no laboratório, foram relevantes para se ter uma noção sobre o comportamento e a frequência das doenças infecciosas, permitindo acompanhar o crescimento e as características físicas, sensoriais e bioquímicas de vários microrganismos diferentes, que representam um problema tanto para saúde pública quanto animal.

Foi possível concluir a necessidade de se ter um conhecimento teórico e prático prévio sobre as características dos agentes patogênicos, como os ambientes em que vivem, sua forma de transmissão e sua virulência, por exemplo, para que haja um direcionamento eficiente, diminuição no desperdício de materiais e um diagnóstico rápido e eficaz. Também foi possível aprender sobre os mecanismos de ação de antimicrobianos em cada organismo e a importância clínica do antibiograma. O período de estágio curricular realizado no laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da Universidade de Brasília foi muito proveitoso, permitindo um aprendizado prático na área de diagnóstico microbiológico, além de noções básicas sobre genética, epigenética, práticas de segurança laboratorial e métodos de prevenção.

Também observou-se a necessidade da aplicação de testes bioquímicos para diferenciar espécies do gênero *Staphylococcus*, utilizando, em amostras oriundas de cães, tanto o plasma de coelho quanto o plasma canino, a fim de determinar se a bactéria em questão é ou não patogênica em cães. Esse procedimento é recomendado com a finalidade de melhorar a qualidade dos diagnósticos, visto que mais de um terço das amostras são diagnosticadas como *Staphylococcus* spp e mais de dois terços das coletas são de origem canina, aprimorando a boa parte dos diagnósticos laboratoriais, sendo, pois, de interesse do laboratório.

Além disso, a realização e acompanhamento dos testes foram de suma importância para um aprofundamento do conhecimento de tais análises, assim como a participação no concurso Ágar Arte e nas leituras feitas com os livros presentes no laboratório e discussões sobre diversos casos com colegas, principalmente os técnicos e residentes.

Assim, elucidou-se o comportamento adequado em um laboratório de biossegurança, a importância e responsabilidade de se fazer a identificação microbiológica rápida e eficiente, o valor da comunicação entre a equipe e a importância do trabalho em grupo.

14. REFERÊNCIAS

ADESYIUN, A. A .; SHEHU, L.M. **Detection of staphylo-coagulase using plasmas from various animals**. Veterinary Microbiology, v.10, n.4, p.387- 392, 1985.

ACUMEDIA. **Urea Agar Base (7226) Manual**. 4th edition. 2010. disponível em <<http://www.neogen.com/Acumedia/pdf/ProdInfo/7226 PI.pdf>> Acesso em 05 de junho de 2016.

BABAK, V. **External Quality Assissment Program / EQAP**. DCLS. Teerão. Disponível em <<http://mazums.ac.ir/dorsapax/userfiles/file/moavenat%20darman/94021813.pdf>> Acesso 17 de junho de 2016.

BBL MANUAL. **BBL Enterococcosel Broth**. Rev. 08. Becton, Dickinson and Company. Maryland, 2006. Disponível em <[https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/L007453\(08\)\(0706\)_ES.pdf](https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/L007453(08)(0706)_ES.pdf)> Acesso em 10 de junho de 2016

BRASIL. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos**. Módulo 4. 2004.

BRASIL. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Detecção e Identificação de Micobactérias de Importância Médica**. Módulo 6. 2004. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_6_2004.pdf> Acesso 27 de junho de 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Classificação de risco dos Agentes Biológicos**. Brasília: Editora MS, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Diretrizes gerais para o trabalho em contenção com Agentes Biológicos**. Brasília: Editora MS, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Biossegurança em laboratórios biomédicos e de**

microbiologia. Terceira edição . Brasília, 2006.

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

BLAZEVIE, D. J. **Appl. Microbiol.** 16, 668. 1968.

CHAN, P. C. K. & PORSCHE R. K. **J. Clin. Microbiol.** 6, 528-529. 1977.

CHRISTENSEN, W. B.; **Urea Decomposition as a Means of Differentiating Proteus and Paracolon Cultures from Each Other and From Salmonella and Shigella Types.** J. Bacteriol. 52:461. 1946.

COICO, R.; LUNN, G. **Biosafety: guidelines for working with pathogenic and infectious microorganisms.** Current Protocols in Immunology, cap.1A, unid.1A, 2005.

COSTA, M.A.F. **Biossegurança: segurança química básica para ambientes biotecnológicos e hospitalares.** Ed. Santos. São Paulo, 1996.

COWAN, S. T. & STEEL, K. J. **Manual of Methods for General Bacteriology.** ASM. Washington DC, 1966.

CRUZ, L. C. H. **Micologia Veterinária.** Segunda edição. Editora REVINTER. Rio de Janeiro, 2010.

DIFCO & BBL MANUAL. **Manual of Microbiological Culture Media.** Becton, Dickinson and Company. Second Edition. Maryland, 2009.

DIFCO & BBL MANUAL. **Manual of Microbiological Culture Media.** Becton, Dickinson and Company. Maryland, 2003.

EWING, W. H. & EDWARDS, P. R. **Bull. Bact. Nomen. And Taxon.** 10. 1-12. 1960.

FACKLAM, R. **Appl. Microbiol.** 26, 138-145. 1973.

FONSECA, I. C. F. **Relato de atividades realizadas no laboratório de microbiologia**

veterinária do hospital veterinário – UnB. Brasília, 2015.

GOMES, M. J. P. **Gênero *Staphylococcus* spp.** UFRGS, 2013. Disponível em <<http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAnero%20Staphylococcus%20spp%204-2013-1.pdf>> Acesso em 26 de junho de 2016.

HABIF, T. B. **Dermatologia Clínica - Guia Colorido para Diagnóstico e Tratamento.** Tradução da 5ª edição. Elsevier Brasil. 2012.

HAMBLETON, P.; BENNETT, A. M.; LEAVER, G. **Biosafety monitoring devices for biotechnology processes.** *Tibtech*, v.10, p.192-199. 1992.

KIMMAN, T. G.; SMIT, E.; KLEIN, M. R. **Evidence-Based Biosafety: a Review of the Principles and Effectiveness of Microbiological Containment Measures.** *Clinical Microbiology Reviews*, v.21, n.3, p.403-425. 2008.

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

LABORCLIN. **Manual para Antibiograma, Difusão em Disco (Kirby & Bauer).** Pinhais, 2011.

LEIFSON, E. J. **Path. Bact.** 40. 581. 1935.

LIVE, I. **Specific and cross- reacting antigens of *Staphylococcus aureus* of human and canine origins.** *Journal of Clinical Microbiology*, v.21, n. 1, p.43- 45. 1985.

MACFADDIN, J. F. **Biochemical Testes for Identification of Medical Bacteria** - pag. 154. The Williams & Wilkins Company. Baltimore, 1976.

MARTINEZ, T.C.N.; LABORDA, S.S.; ANUNCIAÇÃO, A. V. M. ; ALMEIDA, M. G.A. A.; ROCHA, C.C.M; PINHEIRO, D.P. M.; FIGUEIREDO, A. **Caracterização de *Staphylococcus* sp. Isolados de Processos Infeciosos de Caninos Utilizando Plasmas de Diferentes Espécies Animais.** *Rev. Bras. Saúde Prod. An.* 1(2):48-53. 2001. Disponível em <<http://www.rbspa.ufba.br/index.php/rbspa/article/view/590/311>> Acesso

em 22 de junho de 2016.

MBIOLOG DIAGNÓSTICOS Ltda. **Instruções de Uso – Caldo Lisina Descarboxilase.**

Versão 01. Contagem, 2010. Disponível em

<http://www.mbiolog.com.br/produtos/Caldo_Lisina_Descarboxilase.pdf> Acesso em 12 de junho de 2016.

MBIOLOG DIAGNÓSTICOS Ltda. **Instruções de Uso – Caldo Ornitina Descarboxilase.**

Revisão 21. Contagem, 2014. Disponível em < [http://www.mbiolog.com.br/site/wp-](http://www.mbiolog.com.br/site/wp-content/uploads/2013/12/Bula-Caldo-Ornitina-vs02.pdf)

[content/uploads/2013/12/Bula-Caldo-Ornitina-vs02.pdf](http://www.mbiolog.com.br/site/wp-content/uploads/2013/12/Bula-Caldo-Ornitina-vs02.pdf)> Acesso em 13 de junho de 2016.

MENOLASINO N. J.; GRIEVES B., PAYNE P. J. **Lab. Clin. Med.** 56, 908-910. 1960.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Políticas de Saúde. **Programa Nacional de DST e Aids - Técnica de coloração de GRAM.** Brasília, 2001. Disponível em

<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/115_03gram.pdf> Acesso em 26 de junho de 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Centro de referência

Professor Hélio Fraga. **Manual de bacteriologia da tuberculose.** Terceira Edição. Rio de

Janeiro, 2005. Disponível em <[http://www.saude.mt.gov.br/upload/documento/81/manual-](http://www.saude.mt.gov.br/upload/documento/81/manual-de-bacteriologia-da-tuberculose-[81-080909-SES-MT].pdf)

[de-bacteriologia-da-tuberculose-\[81-080909-SES-MT\].pdf](http://www.saude.mt.gov.br/upload/documento/81/manual-de-bacteriologia-da-tuberculose-[81-080909-SES-MT].pdf)> Acesso em 27 de junho de

2016.

OIE, World Organisation for Animal Health. **Diagnostic tests.** Disponível em

<[http://www.oie.int/our-scientific-expertise/veterinary-products/diagnostic-](http://www.oie.int/our-scientific-expertise/veterinary-products/diagnostic-tests/)

[tests/](http://www.oie.int/our-scientific-expertise/veterinary-products/diagnostic-tests/)> Acesso em 02 de junho de 2016.

OLIVEIRA, S. J. **Microbiologia Veterinária Guia Bacteriológico Prático.** EDITORA DA ULBRA. Canoas, 1995.

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

OLSEN A. M. & SCOTT W. J. **Nature** 156. 337. 1946.

OXOID. **Manual Oxoid**. Primeira edição (português). 2000.

PIRES, R. F. L. C. **Relato de atividades realizadas no laboratório de microbiologia veterinária do hospital veterinário – UnB**. Brasília, 2013.

POP 67_00. **Protocolo para processamento e análise de amostras de urinas suspeitas para leptospirose do Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da UnB**. Brasília, 2015.

QUINN, P.J., CARTER, M.E., MARKEY, B., CARTER, G.R. **Clinical Veterinary Microbiology**. Mosby-year Book Europe. London, 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.

SABOURAUD R. '**Les Teignes**', Masson. Paris, 1910.

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

TAYLOR, W. I. & HARRIS, B. **Am. J. Clin Path**. 44. 476-.1965

TEIXEIRA, P.; VALLE, S. **Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1996.

WILSON, C. S. & MILES, A. A. **Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity**. 5Th Edn. Vol.1. Edward Arnold. pp. 493-494. London, 1964.

WINDLE, T. E. '**The Examination os Waters and Water Supplies**'. 7th ed. Churchill Ltd., pp.414 and 422. London, 1958.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Laboratory biosafety manual**. 3.ed. Geneva: WHO, 2004.