



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

LUCIANE SARDINHA

**DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES REALIZADAS NO LABORATÓRIO DE
MICROBIOLOGIA MÉDICA VETERINÁRIA DO HOSPITAL VETERINÁRIO DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UNB**

Brasília

2013

LUCIANE SARDINHA

**DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES REALIZADAS NO LABORATÓRIO DE
MICROBIOLOGIA MÉDICA VETERINÁRIA DO HOSPITAL VETERINÁRIO DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UNB**

Relatório de atividades 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

2013

SARDINHA, LUCIANE.

Descrição das atividades realizadas no Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária do Hospital Veterinário da Universidade de Brasília/ Luciane Sardinha, orientação de Simone Perecmanis – Brasília, 2013.

Relatório de Estágio – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2013.

Cessão de Direitos

Nome do Autor: Luciane Sardinha

Título do Relatório de estágio para Conclusão de Curso: Descrição das atividades realizadas no Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária do Hospital Veterinário da Universidade de Brasília.

Ano: 2013

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias deste relatório e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. A autora reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte deste relatório pode ser reproduzida sem a autorização por escrito da autora.

Luciane Sardinha

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do Autor: SARDINHA, LUCIANE

Título: Descrição das atividades realizadas no Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária do Hospital Veterinário 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

Aprovado em:

Banca examinadora:

Profa. Dra. Simone Perecmanis Instituição: UnB

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profa. Dra. Ângela Patrícia Santana Instituição: UnB

Julgamento: _____ Assinatura: _____

MSc. Ana Paula Paiva de Faria Instituição: UnB

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha vida e por sempre estar comigo iluminando o meu caminho e me abençoando.

Aos meus pais, pelo incentivo, amor e colaboração em todos os aspectos e principalmente pelo investimento na minha educação durante todos esses anos.

À minha orientadora Simone Perecmanis pelos esclarecimentos, correções e sugestões que contribuíram para a realização do meu trabalho de conclusão de curso.

Ao pessoal do laboratório de Microbiologia Médica Veterinária do Hospital Veterinário da UnB, residentes e técnicos do laboratório, que proporcionaram um ambiente agradável e descontraído durante o meu período de estágio curricular, me ajudaram no momento de tirar as fotos e também contribuíram para a conclusão do meu trabalho com sugestões e esclarecimentos.

Aos meus amigos e familiares, pelo incentivo e apoio durante esse processo.

SUMÁRIO

1.	Introdução	Pág. 6
2.	Estrutura e rotina do laboratório de microbiologia Médica Veterinária da Universidade de Brasília –UnB.	Pág. 7
2.1	Meios de Cultura	Pág. 9
2.2	Ágar Sangue Base®	Pág. 9
2.3	Ágar MacConkey®	Pág. 10
2.4	Ágar EMB® (EosinMethylene Blue)	Pág. 11
2.5	Ágar Cetrimidas®	Pág. 13
2.6	Ágar Sabouraud®	Pág. 14
2.7	Ágar Micobiótico®	Pág. 15
2.8	Ágar CLED® (Cystine Lactose Electrolyte Deficiente)	Pág. 16
2.9	Ágar Müeller Hinton®	Pág. 16
2.10	Caldo Tioglicolato®	Pág. 16
3.	Descrição geral sobre a rotina do laboratório	Pág. 17
3.1	Descrição dos procedimentos de cultura e isolamento bacteriológico das amostras mais frequentes que chegaram ao laboratório.	Pág. 18
3.1.1	Cultura	Pág. 18
3.1.2	Procedimento para Isolamento	Pág. 19
3.1.3	Repique	Pág. 20
3.1.4	Método de coloração de Gram	Pág. 23
3.2	Testes bioquímicos	Pág. 24
3.2.1	Teste da catalase	Pág. 24
3.2.2	Teste da oxidase	Pág. 25
3.2.3	Teste do hidróxido de potássio (KOH)	Pág. 25
3.2.4	Indol	Pág. 26
3.2.5	Vermelho de Metila (VM)	Pág. 27
3.2.6	Teste de Voges Proskauer (VP)	Pág. 28
3.2.7	Citrato	Pág. 29
3.2.8	Oxidação/Fermentação	Pág. 30
3.2.9	TSI (Triple Sugar Iron Agar)	Pág. 31
3.2.10	Descarboxilase (lisina, ornitina, arginina)	Pág. 32
3.3	Descrição dos Microrganismos mais frequentes na rotina do laboratório	Pág. 33
3.4	Antibiograma	Pág. 34
3.5	Cultura Fúngica	Pág. 35
3.5.1	Cultura de Fungos Dermatófitos	Pág. 36
3.5.2	Cultura para isolamento e identificação de leveduras do Gênero <i>Malassezia</i> spp	Pág. 37
4.	Considerações Finais	Pág. 39
5.	Referências Bibliográficas	Pág. 40

1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos são encontrados em todos os ambientes, incluindo solo, água e ar e participam das funções vitais observadas nas diversas formas de vida, seja contribuindo para a manutenção do equilíbrio daquele sistema ou de forma oportunista causando doenças e desequilíbrio fisiológico (QUINN et al. 2005).

A análise microbiológica é de grande importância em um hospital veterinário, pois, através dos procedimentos de cultura de material e análise bioquímica pode-se observar e identificar os microrganismos que causam ou colaboram para a instalação de uma enfermidade no animal. Além disso, é possível identificar o grau de patogenicidade de determinado microrganismo, o grau de contaminação do ambiente, a recorrência e a frequência de determinado agente patológico nas amostras avaliadas (KONEMAN et al, 2001).

O exame microbiológico também permite a identificação do agente patogênico. o resultado desse exame dependerá do estágio da doença da precisão com que o material foi coletado e da exatidão da história clínica que acompanha a amostra do paciente, favorecendo a escolha de um tratamento eficaz por meio, por exemplo, da realização de antibiograma (QUINN et al, 2005).

Esse contexto, associado ao exame microbiológico, um histórico clínico completo, incluindo idade, sexo, espécie, número de animais afetados e tratamento realizado devem acompanhar os espécimes, junto com a suspeita do diagnóstico clínico. Na ausência dessas informações, procedimentos importantes para detecção de patógenos podem não ser realizados (QUINN et al, 2005).

As amostras que são encaminhadas ao laboratório de microbiologia devem, de preferência, ser obtidas de animais vivos antes da administração de antibioticoterapia. Amostras de animais mortos deverão ser colhidas o quanto antes, se possível, sem alterações autolíticas ou putrefativas. Quando houver locais onde provavelmente haja contaminação por mais de um patógeno, os espécimes devem ser colhidos mediante procedimentos que minimizem a contaminação, se faz necessário a refrigeração (QUINN et al., 2005).

Portanto, o diagnóstico microbiológico rápido e eficiente é necessário, já que as enfermidades infecciosas dos animais e as zoonoses, em particular as de natureza epizootica, estão adquirindo uma importância econômica e social cada vez maior nos países industrializados e em desenvolvimento. Algumas enfermidades infecciosas emergentes podem ultrapassar rapidamente a esfera local e passar dos animais às pessoas (OIE, 2000).

Este trabalho teve por objetivo descrever as atividades desenvolvidas no Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária entre os períodos de 01 de abril a 01 de julho.

2. ESTRUTURA E ROTINA DO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA MÉDICA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB

Em um período de doze semanas do dia 01 de abril à 01 de julho foi cumprido o meu estágio curricular para conclusão de curso no Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária do Hospital Veterinário da UnB, cuja responsável pelo laboratório é a professora doutora Simone Perecmanis que conta com o auxílio de quatro residentes em doenças infecciosas e três técnicos de laboratório.

O laboratório pode ser classificado como nível um de biossegurança e possui uma estrutura dividida em três salas representadas nas figuras 1.1, 1.2 e 1.3.



Figura 1.1 – Setor de Bacteriologia e Micologia onde são realizados os testes microbiológicos das amostras que chegam ao Laboratório.

Fonte: Arquivo pessoal/ Luciane Sardinha.



Figura 1.2 – Setor de preparo de meios e soluções onde estão estocados os meios de cultura desidratados e materiais para o preparo desses meios.

Fonte: Arquivo pessoal/ Luciane Sardinha.



Figura 1.3 – Sala de lavagem e esterilização onde são autoclavados os materiais contaminados e os tubos que serão reutilizados.

Fonte: Arquivo pessoal/ Luciane Sardinha.

Alguns dos constituintes principais que compõem o Laboratório serão descritos a seguir:

O Setor de Bacteriologia e Micologia contém duas bancadas para a realização dos testes e experimentos, duas estufas para o fornecimento de uma temperatura ideal ao crescimento dos microrganismos cultivados, três geladeiras sendo que uma está destinada ao armazenamento de amostras contaminadas contendo microrganismos os quais não foram identificados e ainda estão sendo utilizados para a conclusão do laudo, e outras duas que estocam os meios de cultura e reagentes utilizados nos testes para diagnóstico, contém também vidros com discos de antibióticos utilizados nos antibiogramas e outros materiais utilizados em experimentos de mestrado e projetos dos estudantes de graduação. A sala principal ainda contém quatro microscópios, sendo que três estão dispostos sobre uma mesa que também é utilizada para pesquisa e estudo e um computador em que são digitados e emitidos os laudos, uma pia para lavagem e antisepsia das mãos e um aparelho de fluxo laminar para manipulação de materiais em ambiente estéril utilizado em experimentos e processamento dos meios de cultura.

Além do setor de bacteriologia e micologia, há o setor de preparo de meios e soluções, onde estão estocados meios de cultura desidratados para que sejam preparados de acordo com a demanda, dentre esses meios estão os mais utilizados na rotina do laboratório como ágar Sangue®, ágar Cetrimida®, ágar MacConkey® entre outros. Nessa sala há também um destilador, um filtro contendo água destilada para utilização na rotina do laboratório, duas estufas, uma balança de precisão para o preparo dos meios de cultura, materiais para o preparo e acondicionamento desses meios como tubos de vidro, erlenmeyer, provetas e pipetas.

O setor de lavagem e esterilização é destinado a autoclavagem de materiais contaminados, lavagem de vidrarias como placas de Petri e tubos que serão lavados e autoclavados para reutilização. Essa sala contém dois autoclaves utilizados para esterilização de materiais e meios de cultura, duas estufas e uma pia.

Existe ainda uma extensão do Laboratório para análise molecular situada em outra sala de uso comum do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária onde se realizam as técnicas de PCR e análise de DNA.

2.1 Meios de Cultura

Os meios de cultura mais utilizados no laboratório são o ágar sangue Base®, ágar MacConkey®, ágar EMB® (Eosin Methylene Blue), Cetrimida®, ágar Sabouraud®, ágar micobiótico®, ágar CLED® (cystine lactose eletrolytedeficiente), Müller Hinton®, caldo Tioglicolato®.

2.2 Ágar Sangue Base®

O ágar sangue® é um meio de cultura altamente nutritivo para a maioria dos microrganismos fastidiosos proporcionando um bom crescimento sendo considerado o ágar padrão inicial para cultura bacteriana no laboratório. A presença de sangue também é usada na determinação da atividade hemolítica. A concentração desse ágar é de 5% de

sangue para o total de meio preparado. A figura 2 evidencia uma placa de Petri de ágar Sangue utilizada no laboratório (OXOID, 2000).



Figura 2 – Placa de Petri contendo o meio Ágar Sangue Base® antes de ser inoculada.

Fonte: Arquivo pessoal/ Luciane Sardinha

2.3 Ágar MacConkey®

Contém Cristal violeta e sais de bile que atuam como inibidores das bactérias Gram positivas sendo um meio seletivo para as bactérias Gram negativas. Geralmente os sais de bile inibem o crescimento em “véu” do *Proteus spp.* Apresenta o vermelho de fenol como indicador de pH. Com o crescimento de uma bactéria fermentadora de lactose nesse meio ocorre a formação de ácido como produto final baixando o pH do meio e a colônia adquire uma coloração rosa, se as bactérias cultivadas no meio não são fermentadoras de lactose elas utilizam as peptonas do ágar como fonte de nitrogênio e os produtos metabólicos são alcalinos consequentemente as colônias apresentam uma coloração pálida (QUINN et al, 2005; QUINN et al 1994). As figuras 3 e 4 apresentam respectivamente uma Placa de Petri contendo o meio de cultura puro sem estar inoculado e meio de cultura com presença de crescimento de bactérias fermentadoras de lactose.

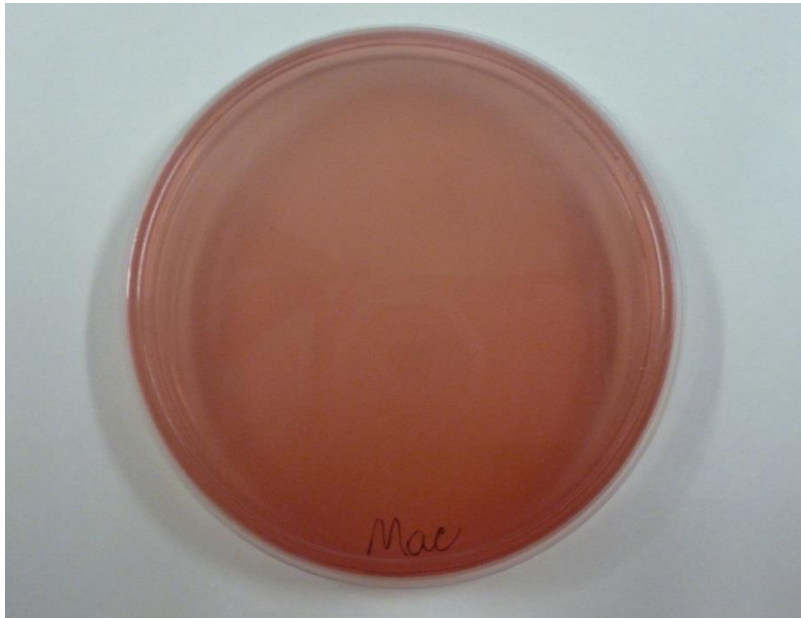


Figura 3 – Placa de Petri com o meio de cultura Ágar MacConkey® antes de ser inoculado.

Fonte: Arquivo pessoal/ Luciane Sardinha.



Figura 4 – Cultura da bactéria *Escherichia coli* em Ágar MacConkey® evidenciando uma característica de crescimento de coloração rosa típica das bactérias fermentadoras de lactose.

Fonte: Arquivo Pessoal/ Luciane Sardinha.

2.4 Ágar EMB® (Eosin Methylene Blue)

É um meio seletivo para isolamento e diferenciação de bastonetes Gram negativos (enterobactérias entre outros).

Este ágar contém corantes de eosina e azul de metileno que inibem as bactérias Gram positivas, funcionam também como indicadores de diferenciação entre bactérias fermentadoras ou não de lactose, por exemplo a bactéria *Escherichia coli* apresentará colônias de coloração verde metálico, enquanto que as colônias de *Salmonella sp* e *Shigella sp* possuem o crescimento incolor nesse ágar (BIOMEDICINA, 2013). A figura 5 mostra uma foto de uma placa de Petri contendo o meio de cultura EMB® e a figura 6 representa uma placa de ágar EMB® com crescimento de *Escherichia coli* evidenciando a característica de crescimento verde metálico desse microrganismo nesse meio.

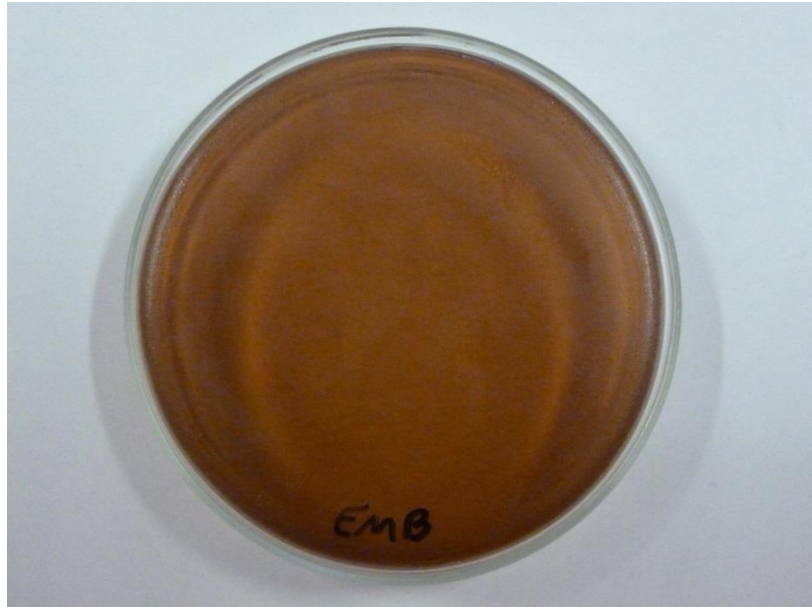


Figura 5 – Placa de Petri contendo o meio Ágar EMB® antes da semeadura da amostra.

Fonte: Arquivo pessoal/ Luciane Sardinha.

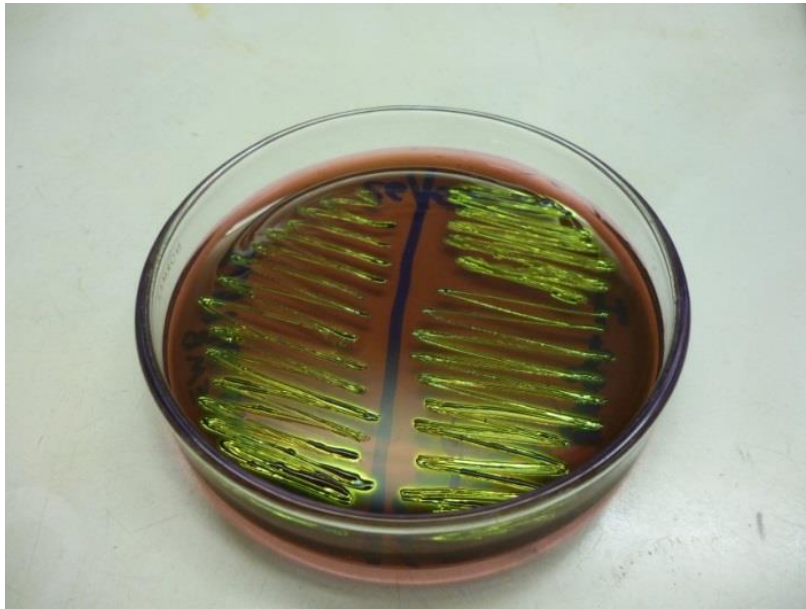


Figura 6 – Cultura de *Escherichia coli* em ágar EMB® evidenciando uma característica de crescimento com brilho verde metálico típica desse microrganismo.

Fonte: Arquivo pessoal/ Luciane Sardinha.

2.5 Ágar Cetrimida®

Este ágar favorece a produção de piocianina e fluoresceína quando há crescimento da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* deixando o meio com uma coloração verde fluorescente característica. Este meio de cultura inibe o crescimento de muitos microrganismos facilitando o crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* (BIOBRÁS). A figura 7 evidencia colônias da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* mostrando as características de crescimento desse microrganismo nesse ágar.



Figura 7 – Cultura de *Pseudomonas aeruginosa* em ágar Cetrimida® com característica típica de crescimento dessa colônia cor verde fluorescente.

Fonte: Arquivo pessoal/ Luciane Sardinha.

2.6 Ágar Sabouraud®

É um meio com pH ácido para o isolamento de dermatófitos, outros fungos e leveduras (OXOID, 2000). É utilizado no isolamento, identificação e conservação de fungos patogênicos e saprófitas. Para inibir o crescimento de outros microrganismos alguns são constituídos com antimicrobianos como cloranfenicol, cicloheximida, penicilina, estreptomicina. O Sabouraud é um meio de peptona suplementado com dextrose para suporte do crescimento de fungos. As peptonas são fontes de fatores de crescimento nitrogenados. A dextrose proporciona uma fonte de energia para o desenvolvimento de microrganismos (BIOBRÁS). A figura 8 apresenta uma fotografia de placa de Petri de ágar Sabouraud® preparada no laboratório.

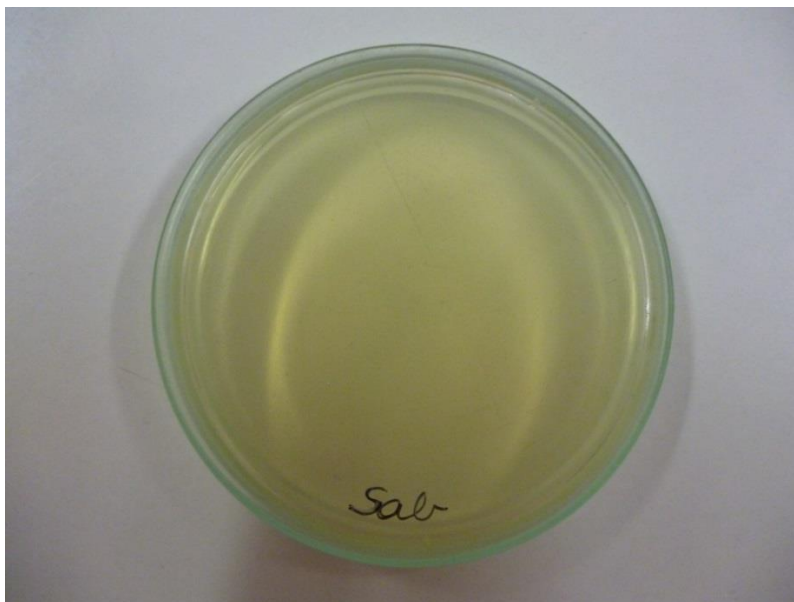


Figura 8 – Placa de Petri pura de Ágar Sabouraud® antes de ser inoculado.

Fonte: Arquivo pessoal/ Luciane Sardinha.

2.7 Ágar Micobiótico®

O ágar Micobiótico® é um meio de cultura específico para o crescimento de fungos patogênicos provenientes de materiais que possuem uma variedade de outros microrganismos e que devem ter o crescimento inibido. Este meio contém nutrientes fornecidos pelas peptonas, contém glicose que é uma fonte de energia em sua composição, Cicloheximida que é um inibidor de fungos não patogênicos. (BD, 2003). A figura 9 mostra uma placa de Petri contendo ágar micobiótico® puro.

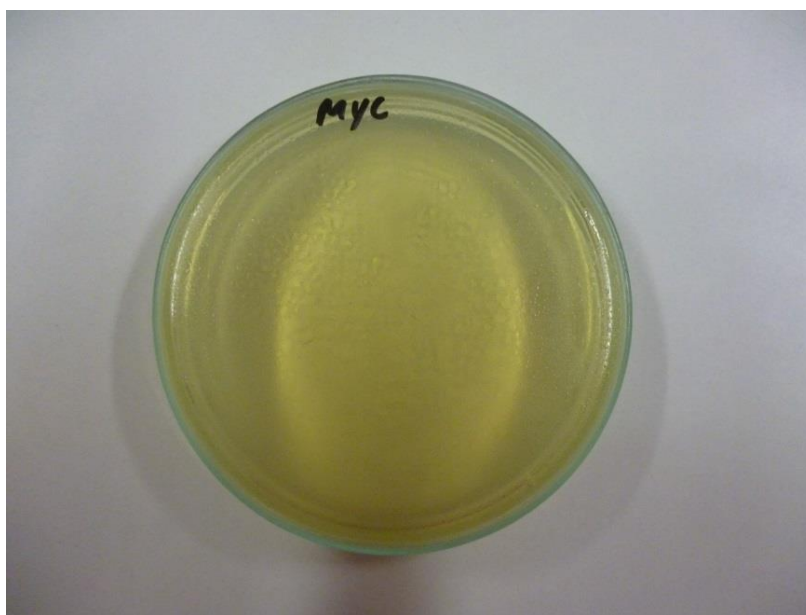


Figura 9 – Placa de Petri com meio Ágar Micobiótico® antes de ser inoculado.

Fonte: Arquivo pessoal/ Luciane Sardinha.

2.8 Ágar CLED® (cystine lactose electrolyte deficiente)

É utilizado para cultura e isolamento de bactérias Gram positivas e Gram negativas em amostras de urina impedindo a formação do crescimento em “nuvem” do *Proteus spp* devida a deficiência de eletrólitos em sua constituição. Permite o crescimento de grande parte das bactérias patogênicas urinárias possibilitando o isolamento e identificação das colônias (ANVISA, 2004). A figura 10 apresenta uma placa de ágar CLED® antes de ser usada.

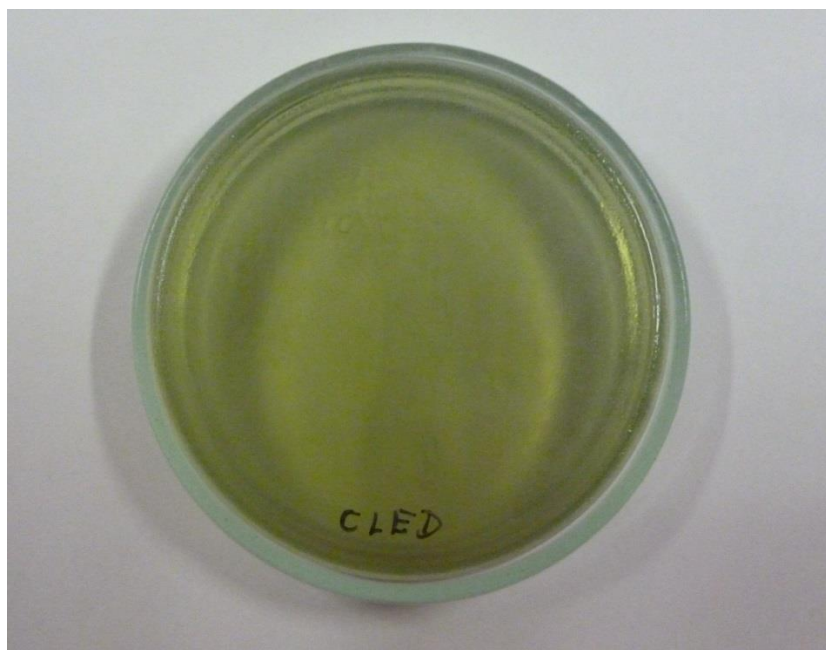


Figura 10 – Placa de Petri contendo o meio Ágar CLED® antes de ser inoculado.

Fonte: Arquivo pessoal/ Luciane Sardinha.

2.9. Müller Hinton®

É um meio rico em nutrientes e é mais usado para a realização de antibiogramas (teste de sensibilidade a antimicrobianos) pela técnica de difusão de discos. É considerado um meio 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 (OXOID, 2000).

2.10. Caldo Tioglicolato®

É um meio de cultivo de microrganismos aeróbios e anaeróbios. É considerado um meio tamponado, portanto inóculos ácidos ou alcalinos não produzem interferência significativa no meio, pois o teor de tioglicolato neutraliza o efeito bacteriostático contribuindo para o crescimento de microrganismos (OXOID, 2000). A figura 11 mostra um recipiente contendo tubos com o meio caldo Tioglicolato.



Figura 11 – Recipiente contendo tubos com o meio caldo tioglicolato® antes da inoculação de microrganismos.

Fonte: Arquivo Pessoal/ Luciane Sardinha.

3. DESCRIÇÃO GERAL SOBRE A ROTINA DO LABORATÓRIO

Em um período de três meses que correspondeu ao dia 01 de abril a 01 de julho, foram recebidas no laboratório 176 amostras para análise bacteriológica tais como swab de secreções de abscesso, líquido, secreção nasofaríngea, de ouvido, outros materiais como leite, urina, fezes e sangue. Dessas 176 amostras as mais frequentes foram as de urina representando 42% do total de material enviado para análise e swab de ouvido representando 34%.

A rotina do laboratório consiste no recebimento das amostras que se distinguem em análises bacteriológicas e análises fúngicas que devem vir acompanhadas da ficha de identificação devidamente preenchida com os dados do paciente em que foi coletado, Na ficha de identificação do animal pode estar a suspeita do agente etiológico causador da enfermidade o que oferece uma direção a seguir no momento da execução dos testes para diagnóstico. posteriormente a ficha de identificação é anexada à ata de atividades laboratoriais em que são anotados todos os procedimentos realizados para obtenção do diagnóstico de presença ou ausência de microrganismo na amostra. No momento da recepção do material biológico este deve estar acondicionado em frasco individualizado, estéril, identificado e as vezes refrigerado. A figura 12 apresenta uma foto de um recipiente onde foi enviada uma amostra de pelo devidamente identificada com o número do prontuário e obedecendo as demais exigências.

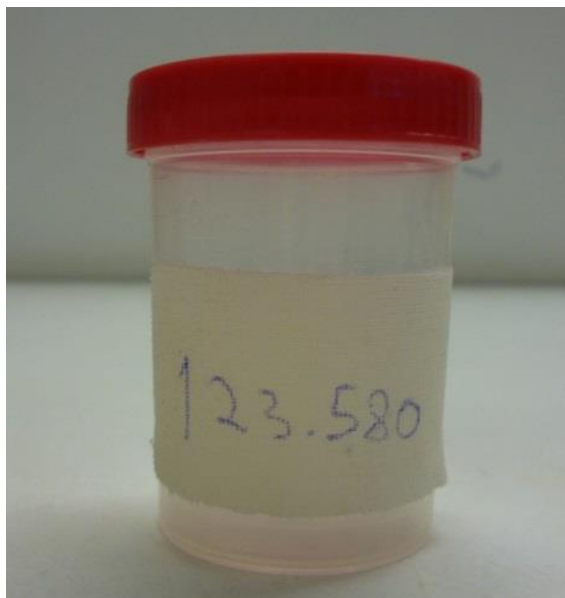


Figura 12 – Recipiente individual identificado contendo amostra de pelo.

Fonte: arquivo pessoal/ Luciane Sardinha

3.1. Descrição dos procedimentos de cultura e isolamento bacteriológico das amostras mais frequentes que chegaram ao laboratório

3.1.1. Cultura

Para cultura de amostras de urina e swab de secreções que foram os materiais enviados com maior frequência, são utilizados os meios ágar sangue base® e caldo tioglicolato®.

Para a cultura de urina adiciona-se aproximadamente três gotas de urina sobre o ágar sangue base® espalhando o material com o auxílio da alça bacteriológica flambada na chama do bico de Bunsen realizando estriações, no caldo tioglicolato adiciona-se de três a quatro gotas no meio flambando a entrada do tubo antes e depois de se inocular a amostra. Já para cultura de amostras provenientes de swabs realiza-se estriações sobre o ágar sangue base® com o swab contendo o material, em seguida com o auxílio de uma pinça cirúrgica e uma tesoura, ambas esterilizadas, corta a parte do swab onde está a amostra no interior do tubo contendo o caldo tioglicolato®.

Após a inoculação, deve-se deixar os meios na estufa por aproximadamente vinte e quatro a quarenta e oito horas para a verificação de crescimento de microrganismos, caso tenha crescido algum microrganismo deve-se analisar na leitura inicial aspectos macroscópicos da placa como hemólise, forma da colônia no ágar, consistência, tamanho, cor e odor. É importante também se verificar na literatura disponível uma possível diferenciação dos grupos bacterianos de acordo com os aspectos macroscópicos. O próximo passo é o isolamento das colônias e preparo de lâmina para a caracterização microbiológica. Caso tenham crescido várias colônias bacterianas realiza-se um procedimento para isolamento e repique com a finalidade de isolamento

e multiplicação da colônia bacteriana suspeita de estar ocasionando a enfermidade ao paciente.

Após o crescimento bacteriano e avaliação da diversidade de colônias que cresceram no meio é necessário que se faça o isolamento das colônias com características diferentes para se identificar qual o agente causador da enfermidade. Caso o meio esteja contaminado com muitas colônias diferentes e não sendo possível o isolamento de uma colônia para análise é necessário que se faça um procedimento para isolamento ou um repique em um meio propício àquele gênero de bactérias de suspeita.

3.1.2. Procedimento para Isolamento

O isolamento é realizado ao fazer o repique do material contaminado, com crescimento de colônias diferentes entre si, em uma nova placa de meio de cultura. Essa nova placa pode conter um meio seletivo para a bactéria suspeita de causar a enfermidade. Após realizada a primeira semeadura, de forma que essas colônias ocupem uma parte do meio, a alça bacteriológica deve ser flambada e resfriada. Em seguida, a alça é colocada na fração final dessa semeadura estriando essa fração em um outro espaço da placa, esse procedimento deve ser realizado até o preenchimento total do meio como mostrado na figura de número 13.



Figura 13 – Placa de ágar CLED® com estrias realizadas para isolamento bacteriano

Fonte: Arquivo pessoal/ Luciane Sardinha

3.1.3. Repique

Após a obtenção de uma cultura pura, esta precisa ser mantida em meio adequado para a sua identificação, ou, se estiver em pouca quantidade, deve ser multiplicada. Para isso, as colônias são transferidas para um novo meio propício ao seu crescimento, por exemplo, um meio de cultura diferencial para bactérias do gênero *Pseudomonas* sp é o ágar Cetrimida®, nesse meio ao crescerem as colônias vão adquirir uma coloração esverdeada (FILHO et al, 2007).

O repique é realizado a partir uma colônia isolada e inoculando-a por meio de estriações centrais com o auxílio da alça bacteriológica na superfície do meio ideal para o crescimento do microrganismo.

No caso do isolamento de bactérias que não sejam do gênero *Proteus* spp que possuem o crescimento em “nuvem” tomando toda a placa, é indicada a realização do repique no ágar CLED® que é um meio de cultura que inibe as cepas de *Proteus* sp, já o ágar MacConkey® é um meio de cultura para isolamento e diferenciação de enterobactérias como a *Escherichia coli*, *Salmonella* sp, *Proteus* sp, *Shigella* spp, *Yersinia* sp, para isolamento da *Escherichia coli* além da inoculação da colônia no Ágar MacConkey® é necessária a cultura no ágar EMB® (Eosin Methilene Blue) que é um meio diferencial para caracterização desse microrganismo. As figura 14 e 15 evidenciam uma placa com o meio de cultura àgar sangue base® e ágar EMB® respectivamente em que foi realizado um repique.



Figura 14 – Repique em Ágar Sangue Base evidenciando um crescimento bacteriano®.

Fonte: Arquivo pessoal/ Luciane Sardinha.



Figura 15 – Repique em Ágar EMB® evidenciando o crescimento da bactéria *Escherichia coli*.

Fonte: Arquivo pessoal/Luciane Sardinha

O diagnóstico laboratorial de microrganismos é baseado na tabela abaixo adaptada de QUINN et al, 1994.

Gram-positivo	Cocos		Oxidativo	Micrococcus spp.		
			Cat.+ / Ox.±			
			Bastonete		Fermentativo	Staphylococcus spp.
					Cat.+ / Ox.-	
					Fermentativo	Streptococcus spp.
					Cat.- / Ox.-	
	Bastonete		Não-reativo	Rhodococcus equi		
			Cat.+ / Ox.-			
			Bastonete		Oxidativo	Nocardia asteroides
					Cat.+ / Ox.-	
			Bastonete		Fermentativo	Actinomyces viscosus
					Cat.+ / Ox.-	
			Bastonete		Cat.+ / Ox.-	Corynebacterium spp. Listeria spp.
					Fermentativo	
Bastonete		Fermentativo	Actinomyces spp. (maioria) Actinomyces pyogenes Erysipelothrix spp.			
		Cat.- / Ox.-				
Bastonete		Cat.- / Ox.-	Clostridium spp. Eubacterium spp. Lactobacillus spp.			
		Não-reativo				
Bastonete		Cat.+ / Ox.-	Rhodococcus equi			

ADAPTADO

Gram-negativo	Cocos	Não cresce no MacConkey	Oxidativo	Neisseria spp. Branhamella spp.	
			Cat.+ / Ox.+		
		Cresce no MacConkey		Oxidativo/Não-reativo	Acinetobacter spp.
				Cat.+ / Ox.-	
	Bastonete	Não cresce no MacConkey	Oxidativo	Flavobacterium spp.	
					Cat.+ / Ox.+
			Fermentativo	Pasteurella spp. (P. caballi: Ox -)	
					Cat.+ / Ox.+
			Não-reativo	Brucella spp. Haemophilus spp.	
					Cat.+ / Ox.+
			Cat.+ / Ox.+	Pasteurella anatipestifer Taylorella equigenitalis	
					Não-reativo
			Cat.± / Ox.+	Moraxella spp. Campylobacter spp.	
					Não-reativo
Cat.+ / Ox.-	Francisella tularensis				
Cresce no MacConkey		Oxidativo	Pseudomonas spp. (maioria)		
		Cat.+ / Ox.+			
		Fermentativo	Aeromonas spp. Pasteurella haemolytica Plesiomonas spp.		
				Cat.+ / Ox.+	
		Fermentativo	Actinobacillus spp.		
				Cat.± / Ox.±	
		Fermentativo	Enterobacteriaceae		
				Cat.+ / Ox.-	
Não-reativo	Bordetella spp. Alcaligenes spp.				
		Cat.+ / Ox.+			

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

Após o isolamento das colônias que cresceram é necessário o preparo de lâmina para visualização no microscópio óptico para se observar a morfologia do microrganismo, no caso de bactérias, se são cocos, bastonetes, vibriões ou espirilos e qual o comportamento frente à coloração de Gram: Se são positivos ou negativos.

Para o preparo das lâminas realiza-se um esfregaço e coloração de Gram.

3.1.4. Método de coloração de Gram

Primeiramente deve-se realizar a identificação da lâmina com grafite na superfície áspera da lâmina ou com lápis termosensível na superfície lisa da lâmina de vidro e marcar com um ponto no lado direito do canto superior para indicar a superfície na qual serão aplicadas as colônias. Com a alça de níquel-cromo estéril coloca-se uma gota de solução salina 0,9% na superfície da lâmina de vidro para microscopia e colhe-se uma pequena quantidade de colônias com alça e aplicando na gota de solução salina espalhando o material na superfície da lâmina. Fixa-se as colônias passando a lâmina brevemente na chama do bico de Bunsen. Para o procedimento de coloração deve-se colocar a lâmina de vidro no suporte para coloração de lâminas e colorir o esfregaço com cristal violeta e aguardar um minuto, escorrer o excesso do cristal violeta e cobrir a superfície da lâmina com lugol por um minuto, deve-se lavar a superfície da lâmina com etanol 100% e cobrir a lâmina por 10 segundos lavando em seguida em água corrente, aplica-se safranina ou fucsina na superfície da lâmina aguardando 15 segundos, lava-se a lâmina em água corrente, deixando-a secar inclinada, aplicar uma gota de óleo de imersão sobre a lâmina e a observa em microscópio óptico em aumento de 1000 vezes, analisa-se a morfologia 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; (POP N°42).

As figuras 16 e 17 mostram respectivamente uma visualização de lâmina de cocos Gram positivos e lâmina com bastonetes Gram negativos vistos em microscopia óptica em um aumento de mil vezes.

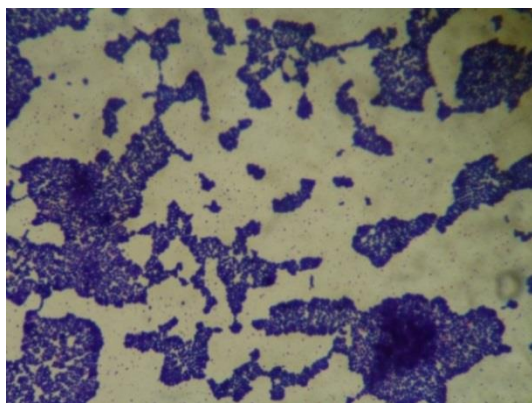


Figura 16 – Cocos Gram positivos

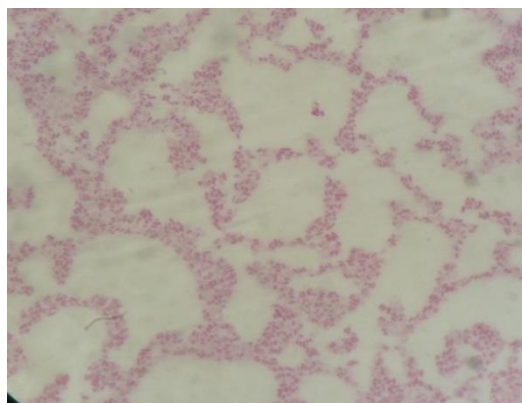


Figura 17 – Bastonetes Gram negativos

Fonte: Arquivo pessoal/Luciane Sardinha

3.2 Testes bioquímicos

Após a triagem pela morfologia e pela coloração de Gram, as bactérias são enquadradas em um esquema de identificação baseado em testes bioquímicos, alguns dos testes realizados com maior frequência no laboratório são o da catalase, hidróxido de potássio (KOH), oxidase, INVIC (Indol, teste vermelho de metila (VM), Voges Proskauer (VP), Citrato) oxidação/fermentação da glicose, TSI, e descarboxilase devida a maior presença de bactérias que exigem tais testes para serem identificadas (OLIVEIRA, 2000).

3.2.1 Teste da Catalase:

Este teste é realizado inoculando a colônia bacteriana que se deseja analisar com o auxílio da alça bacteriológica em uma gota de água oxigenada dez volumes sobre uma lâmina de vidro, flambando previamente a alça no bico de Bunsen para evitar contaminação.

A catalase é uma enzima que decompõe H_2O_2 , liberando oxigênio. Deve-se observar se ocorre a formação ou não de bolhas por aproximadamente 30 segundos, se houver formação o teste é positivo, se não houver, negativo. Este teste permite diferenciação entre gênero de bactérias. Os eritrócitos contêm catalase e por isso deve-se ter cuidado para não colher meio ágar sangue junto com a colônia a ser testada (OLIVEIRA, 2000). A figura 18 evidencia a execução de um teste com o resultado positivo com expressão da formação de bolhas.



Figura 18 – Teste da Catalase com resultando positivo evidenciando a formação de bolhas no momento do contato da colônia bacteriana com a água oxigenada.

Fonte: Arquivo Pessoal/ MSc. Hudson Holanda.

3.2.2 Teste da Oxidase:

O resultado é obtido ao se espalhar a colônia bacteriana com o auxílio da alça bacteriológica de platina previamente flambada e resfriada em uma fita de oxidase, se o local onde a colônia foi friccionada ficar roxo o microrganismo é oxidase positivo, caso não haja alteração na cor o resultado é tido como negativo. Este teste mede a produção de citocromo oxidase que geralmente está presente somente em organismos aeróbios fazendo com que estes usem oxigênio como um receptor de hidrogênio ocorrendo assim, a redução do oxigênio na forma molecular a peróxido de hidrogênio. (OLIVEIRA, 2000). A figura 19 explicita a realização de quatro testes na fita de oxidase sendo detectado um resultado positivo apenas para o segundo teste e o primeiro, terceiro e quarto evidenciando um resultado negativo para a colônia bacteriana testada.

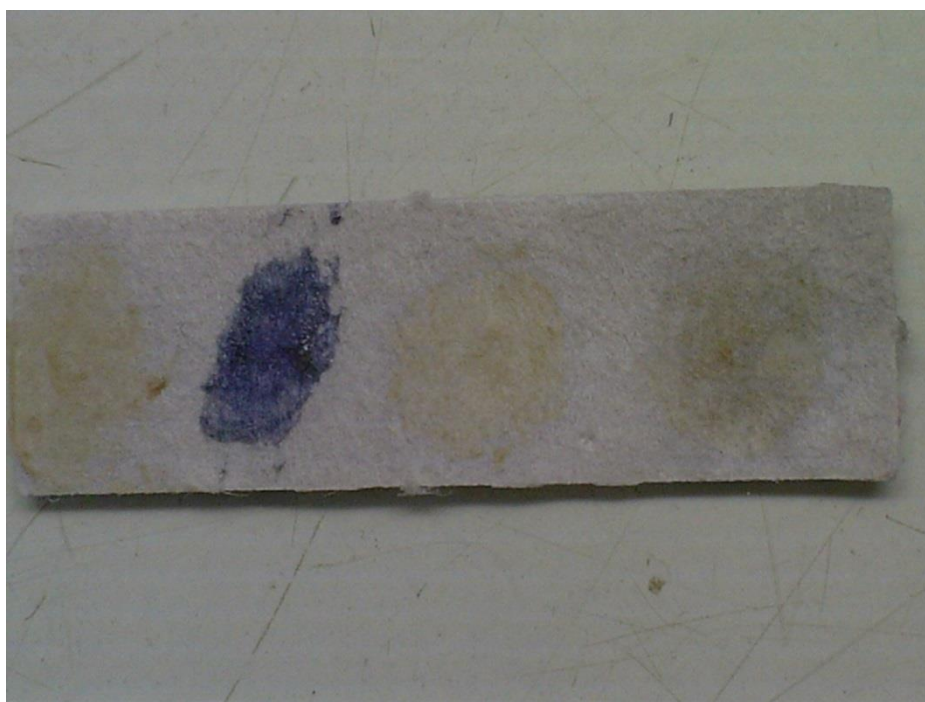


Figura 19 – Primeira, terceira e quarta colônia testada tendo um resultando negativo para o teste da oxidase sendo positivo apenas o segundo teste evidenciando uma característica de coloração roxa da colônia ao ser friccionada sobre a fita de oxidase.

Fonte: Arquivo pessoal/ MSc. Hudson Holanda.

3.2.3 Teste do Hidróxido de Potássio (KOH):

O teste é realizado colocando-se uma gota de KOH 3% em uma lâmina para microscopia com identificação prévia, flambando-se a alça bacteriológica no bico de Bunsen e ao esfriar, coletando-se uma colônia da placa esfregando na lâmina.

Deve-se observar se ocorre mudança na viscosidade do conteúdo por aproximadamente 30 segundos levantando a alça bacteriológica para evidenciar a formação de um fio viscoso. A parede das bactérias Gram negativas não é resistente à

solução de KOH 3% ocorrendo a lise celular, o DNA então reage com o KOH 3% e forma um fio viscoso sendo positivo. A parede das bactérias Gram positivas é resistente ao KOH 3%, por isso não ocorre a lise celular e o material não adquire viscosidade sendo negativo para o teste (QUINN et al, 2005). A figura de número 20 evidencia um resultado positivo para o teste do KOH (hidróxido de potássio) havendo a formação do fio viscoso no momento do contato da colônia bacteriana com a solução de KOH 3%.

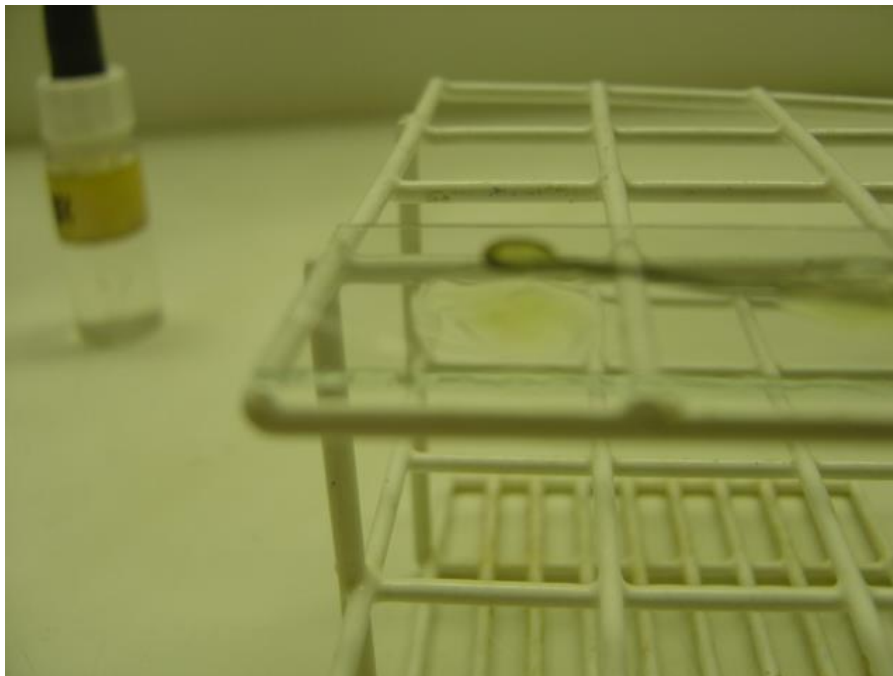


Figura 20 – Teste do KOH evidenciando um resultado positivo pela formação de um fio viscoso ao se friccionar a colônia de interesse na solução de hidróxido de potássio.

Fonte: Arquivo Pessoal/ MSc. Hudson Holanda.

3.2.4 Indol

Contém um reagente que quando ocorre a degradação do triptofano por determinadas bactérias este produz coloração avermelhada.

O teste é realizado adicionando-se 1ml de éter ou xilol a um cultivo de 48 horas em caldo agitando-se e adicionar 0,5 ml de reativo de Erlich pelas paredes do tubo, haverá a formação de um anel de cor avermelhada abaixo da camada de éter se o resultado for positivo, a reação negativa é incolor. A bactéria *Escherichia coli* é considerada controle positivo para o teste e para a bactéria *Salmonella spp* o controle é negativo (OLIVEIRA, 2000). A figura 21 apresenta dois tubos com resultado para o teste de Indol o tubo à esquerda evidencia um resultado positivo e o tubo a direita um resultado negativo.



Figura 21 – O primeiro tubo mostra um resultado positivo com a formação de um anel de cor rosa abaixo da camada de éter enquanto no segundo tubo à direita o resultado se mostra negativo ocorrendo uma reação incolor.

Fonte: Arquivo pessoal/Luciane Sardinha

3.2.5 Vermelho de Metila (VM)

O indicador vermelho de metila é utilizado para determinar o pH quando a bactéria fermenta glicose, este teste é realizado inoculando-se a bactéria no caldo VM/VP aguardando o seu crescimento por 18 a 24 horas, após esse tempo, a fermentação produz metabólitos ácidos, entretanto após aproximadamente cinco dias as bactérias VM positivas não cessam a produção de ácido deixando o pH ácido, já as bactérias VM negativas permanecem metabolizando os produtos iniciais da fermentação por descarboxilação tendo como produto o acetilmetilcarbinol, neutro favorecendo o aumento do pH. A bactéria *Escherichia coli* é controle positivo e a bactéria *Klebsiella pneumoniae* é controle negativo (OLIVEIRA, 2000).

O teste é realizado inoculando-se a bactéria no caldo VM/VP aguardando entre 2 a 5 dias, após esse tempo, adiciona-se cinco gotas de solução de VM se o resultado for positivo haverá a formação de uma cor avermelhada no meio, cor laranja se for intermediário e cor amarela se a bactéria for VM negativa (OLIVEIRA, 2000). A figura 22 apresenta uma foto de um resultado positivo para o teste Vermelho de Metila de determinado microrganismo.

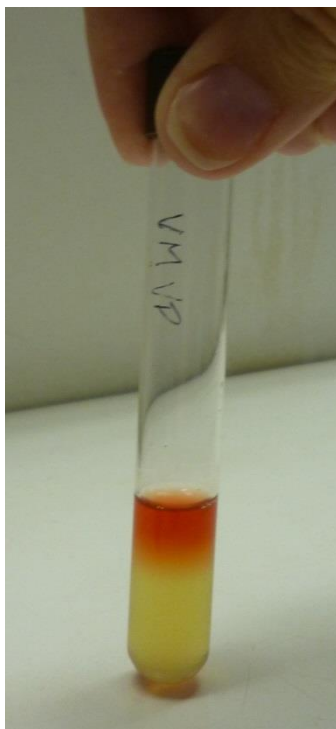


Figura 22 – Teste VM positivo.

Fonte: Arquivo pessoal/ Luciane Sardinha.

3.2.6 Teste de Voges Proskauer (VP)

Este teste mede a produção de acetilmetilcarbinol pela fermentação da glicose através da via butilenoglicólica. (OLIVEIRA, 2000).

Após a execução do teste VM, adicionar ao tubo 0,2 ml de solução aquosa de VP e 0,6 ml de alfa naftol misturar e deitar o tubo por aproximadamente 30 min, se a solução adquirir uma coloração vermelha escura o resultado é positivo como mostrado na figura 23. Caso não haja alteração na coloração, o teste será considerado negativo no teste de VP.



Figura 23 – Teste VP positivo evidenciando a coloração vermelho escura pelo aumento do pH devido a produção do metabólito acetilmetilcarbinol sendo detectado pelos reagentes VP e alfa naftol .

Fonte: Arquivo pessoa/ Luciane Sardinha.

3.2.7 Citrato

Segundo Oliveira (2000), algumas bactérias são capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono, essas bactérias na ausência de fermentação ou de produção de ácido láctico podem obter energia pelo uso do citrato, ao ocorrer esse crescimento o meio de coloração inicial verde adquire uma coloração azul, sendo consideradas citrato positivas, as que não alteram a coloração do meio são Citrato negativas como representado na figura 24. O meio de citrato de Simmons é sólido de cor verde a cultura bacteriana deve ser realizada na superfície com o auxílio da alça.

Este teste permite a diferenciação entre gêneros de bactérias, por exemplo, a *Escherichia coli* é citrato negativa. A figura 24 abaixo apresenta uma foto de dois tubos, o primeiro tubo apresentando o crescimento de uma bactéria citrato negativa e no segundo tubo à direita o crescimento de uma bactéria com resultado positivo para o teste bioquímico do citrato.

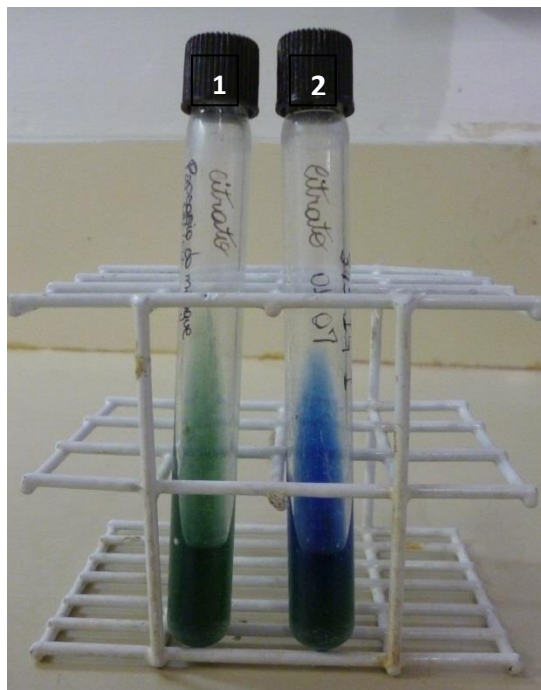


Figura 24 – Tubo nº1 = citrato negativo/ Tubo nº 2 = citrato positivo evidenciando a mudança na coloração do meio pela formação do hidróxido de amônia que reagiu com o corante azul de bromotimol do meio.

Fonte: Arquivo pessoal/ Luciane Sardinha.

3.2.8 Oxidação/Fermentação

O teste demonstra se a bactéria obtém energia utilizando açúcar através da fermentação ou oxidação. O meio utilizado é o Hugh e Leifson (meio OF) (OLIVEIRA, 2000).

As bactérias fermentadoras geralmente são anaeróbias facultativas, o açúcar glicose é fosforilado em glicose-6-fosfato antes de ser fermentado. Já as bactérias oxidativas geralmente são aeróbias estritas (OLIVEIRA, 2000).

O teste é realizado inoculando-se a bactéria de interesse em dois tubos para cada açúcar. Em um dos tubos haverá óleo, o que impede a captação de oxigênio do meio tornando-o anaeróbio. As bactérias oxidativas apresentarão produção de ácido somente no tubo sem óleo pois há o contato com o oxigênio, ou seja, o tubo com óleo permanecerá com a coloração original verde após o período de crescimento e o tubo sem óleo terá coloração amarela enquanto as fermentadoras produzirão ácido em ambos os tubos ficando os dois com o meio de cor amarela. Já quando o resultado não representa reação de oxidação ou fermentação considera-se OF não reativo não havendo produção de ácido em nenhum dos meios e os dois tubos permanecem com a coloração inicial verde (OLIVEIRA, 2000).

Este teste pode ser usado para diferenciar bactérias Gram negativas não entéricas das enterobactérias, pois estas são fermentadoras enquanto as não entéricas oxidam o açúcar. (OLIVEIRA, 2000). A figura 25 apresenta tubos bioquímicos evidenciando o crescimento de bactérias fermentadoras.

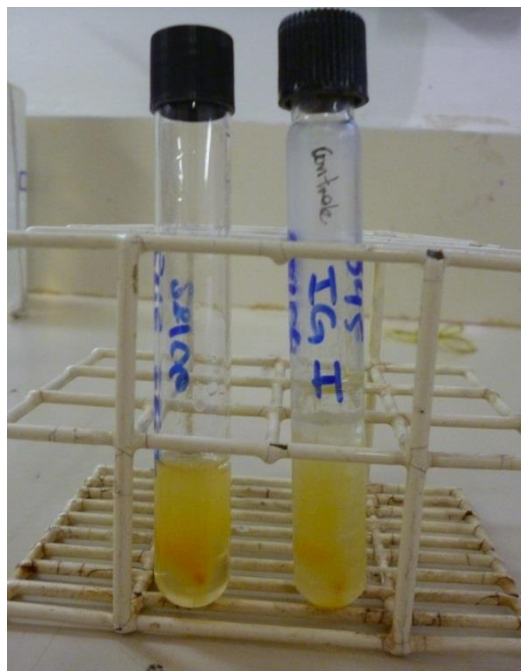


Figura 25 – Crescimento de Bactérias fermentadoras evidenciando a formação de ácido nos tubos havendo mudança de cor inicialmente verde para amarela, por outro lado se as bactérias fossem oxidativas o tubo com óleo permaneceria com o meio de coloração verde.

Fonte: Arquivo pessoal/ Luciane Sardinha.

3.2.9. TSI (Triple Sugar Iron Agar)

Este meio de cultura é usado para determinar se há liberação de H₂S a partir de aminoácidos como a peptona que o constituem, por meio da ação da enzima cisteína desulfidrase. Algumas bactérias reduzem o enxofre por hidrogenação, produzindo H₂S que se liga ao íon ferro presente no meio formando um precipitado de sulfato ferroso negro e insolúvel.

Este teste é realizado inoculando-se a bactéria profundamente e na superfície do ágar TSI observando-se diariamente o crescimento bacteriano por sete dias se o meio se tornar enegrecido o resultado é positivo, pode haver também produção de gás. (OLIVEIRA, 2000). A figura 26 apresenta um tubo em que houve a formação de H₂S no ágar TSI com a ligação desse ácido aos íons ferro contidos no meio formando um precipitado escuro.



Figura 26 – Formação de H₂S pela hidrogenação do enxofre em ágar TSI havendo a ligação aos íons ferro formando um precipitado negro.

Fonte: Arquivo pessoal/ MSc. Hudson Holanda.

3.2.10. Descarboxilase (lisina, ornitina, arginina)

Mede o nível de descarboxilação enzimática do aminoácido por uma bactéria, tendo como produto a amina, resultando na diminuição do pH do meio. Este teste é utilizado para determinar os grupos da família *Enterobacteriaceae* (OLIVEIRA, 2000).

Deve ser feita a inoculação bacteriana em dois tubos sendo que um será o tubo controle do resultado, através da camada de óleo e observação diária do crescimento por um período de quatro dias. É possível observar o meio inicialmente amarelo, devido à produção de ácido da glicose, quando ocorre a descarboxilação, Posteriormente o meio se torna de cor violeta e o controle deve se manter amarelo (OLIVEIRA, 2000). A figura 27 evidencia um resultado positivo para descarboxilação de aminoácido detectado pelo corante deixando o meio de cor violeta enquanto o meio controle permaneceu com a cor amarelada.

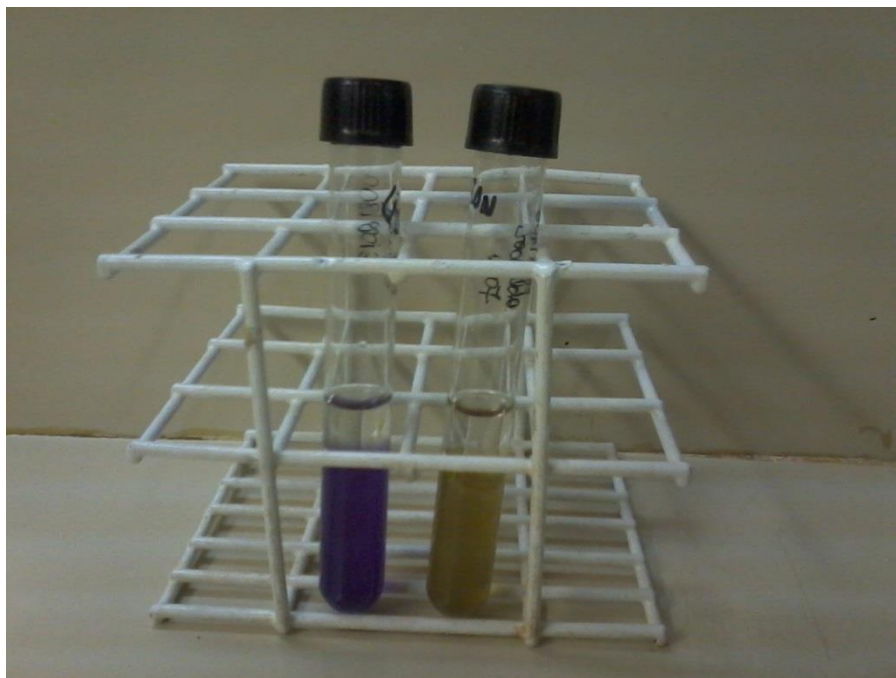


Figura 27 – Descarboxilação enzimática do aminoácido no tubo à esquerda sendo detectado pelo corante do meio de cultura em que o meio controle à direita permaneceu de coloração amarelada pela degradação do açúcar.

Fonte: Arquivo Pessoal/Luciane Sardinha.

3.3 Descrições dos microrganismos mais frequentes na rotina do laboratório

O quadro 1 abaixo, apresenta uma descrição das principais características dos microrganismos mais frequentes nas amostras enviadas ao laboratório de Microbiologia.

	GRAM POSITIVOS
<i>Staphylococcus spp</i>	São cocos Gram positivos, catalase positivos, KOH negativos, oxidase negativos as colônias no ágar sangue são de coloração esbranquiçada ou amarelada devido a formação de pigmento que fica retido no corpo bacteriano, apresentam-se ao microscópio aos pares ou em grupos semelhantes a “cachos de uva”. (OLIVEIRA, 2000)
<i>Streptococcus spp</i>	São cocos Gram positivos que apresentam uma disposição aos pares ou em forma de “colar”. (OLIVEIRA,2000) São considerados organismos fastidiosos necessitando de meios enriquecidos para o crescimento, as colônias vistas na placa de Petri são pequenas, brilhantes, translúcidas e geralmente hemolíticas. São catalase negativos, KOH negativos, geralmente imóveis e anaeróbios facultativos. (QUINN et al, 2005).
<i>Corynebacterium spp</i>	São bastonetes Gram positivos, ao microscópio são organizados em forma de paliçada, imóveis. (OLIVEIRA, 2000).

	São catalase positivos, oxidase negativos, KOH negativos. (QUINN et al, 2005)
	GRAM NEGATIVOS
<i>Proteus spp</i>	São bastonetes Gram negativos, aeróbicos ou anaeróbicos facultativos, são catalase positivos, KOH positivos, oxidase negativos, e são fermentativos. Não são hemolíticos, crescem em ágar sangue em forma de onda ou núvem sobre todo o meio. Não fermentam lactose. (OLIVEIRA, 2000). As colônias possuem um odor característico de lixo.
<i>Escherichia coli</i>	São bastonetes Gram negativos, oxidase negativos, Crescem no ágar MacConkey®, são fermentadoras de lactose adquirindo uma coloração rosa nesse meio devido à produção de ácido a partir da lactose. Em ágar EMB®. (eosinmethylene blue) produz colônia com brilho verde metálico, indol e VM positivo, citrato negativo (QUINN et al, 2005)
<i>Pseudomonas spp</i>	São bastonetes Gram negativos, catalase positivos, KOH positivos, oxidase positivos, são oxidativos em açúcar, crescem em ágar MacConkey® e a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cresce em ágar Cetrimidás®. adquirindo uma coloração esverdeada e possui um odor adocicado característico. (OLIVEIRA, 2000)

Quadro 1: Descrição das principais características dos microrganismos mais frequentes nas amostras enviadas ao laboratório de Microbiologia.

Após o diagnóstico estabelecido de infecção bacteriana e o agente etiológico da enfermidade é realizado um antibiograma para a detecção do antibiótico à qual aquela espécie é responsiva, esses antibióticos serão caracterizados de acordo com a sensibilidade da bactéria a eles em sensível, intermediário e resistente ao antibiótico testado.

3.4 Antibiograma

O antibiograma só será realizado em bactérias previamente isoladas e identificadas e deve ser coletada uma pequena amostra da colônia que foi isolada, com o auxílio de uma alça bacteriológica previamente flambada em bico de Bunsen. Esta amostra deve ser inoculada em caldo BHI® ou se a bactéria for de fácil crescimento pode ser inoculado em um caldo formado por açúcar como, por exemplo, a salicina, levando esse meio à estufa até que ocorra um prévio crescimento do microrganismo. Com o auxílio de um swab esterilizado, espalhar o caldo em várias direções em uma placa de Petri contendo Ágar Müller Hinton®, no caso de microrganismos fastidiosos deve-se utilizar o ágar Müller Hinton sangue®, de forma que este seja completamente coberto; deve-se verificar visualmente se não há contaminação da placa de Ágar Müller Hinton®; o swab a ser utilizado deve estar em embalagem devidamente lacrada. Após a inoculação no ágar deve-se flambar uma pinça na chama do bico de Bunsen, esfriar a mesma e pinçar um disco de antibiótico de dentro do frasco

envoltório, que deverá ser colocado na placa. Este procedimento deve ser feito com todos os antibióticos que serão utilizados no teste que são aproximadamente 14 tipos, já previamente definidos, por exemplo, se é uma infecção respiratória os antibióticos são diferentes de uma infecção de pele; os discos devem ser dispostos difusamente de forma que fiquem o mais longe possível um do outro. Sem nenhum contato com outra superfície, pois isso implica em contaminação do disco, Manter o antibiograma na estufa a 37° C por 18 horas;

A leitura dos resultados deve ser feita de acordo com as normas do CLSI, que serve de parâmetro para medição do halo de inibição do crescimento formado ao redor de cada disco antibiótico. A tabela de antibióticos ajuda na conversão de siglas relacionadas a cada antibiótico, pois estas variam de acordo com o fabricante. Caso na leitura do antibiograma seja detectado resistência bacteriana a todos os antibióticos testados deve-se realizar outro teste de sensibilidade utilizando antimicrobianos diferentes. (POP N° 57). A figura 28 apresenta respectivamente um antibiograma realizado para microrganismos fastidiosos em àgar Müller Hinton sangue® e um antibiograma realizado em àgar Müller Hinton®.

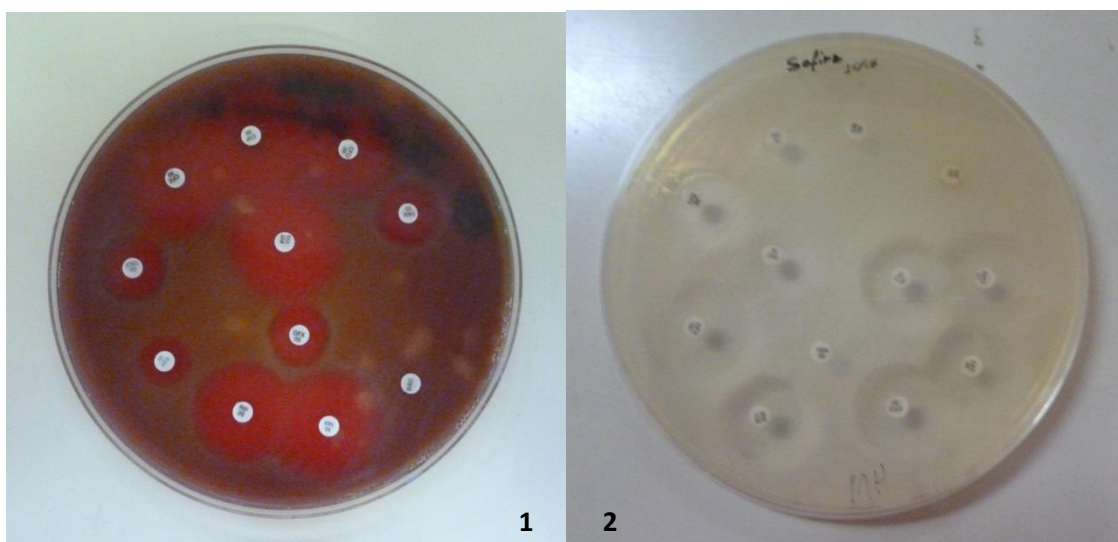


FIGURA 28 -Antibiograma em Müller Hinton sangue (1) e Müller Hinton comum (2).

Fonte: Arquivo pessoal/ Luciane Sardinha.

3.5. Cultura Fúngica

Na rotina de exames microbiológicos dos materiais que chegaram ao hospital veterinário para análise fúngica foram recebidas amostras de casco, raspado de pele, esfregaço de pele sendo predominantes as amostras de pelo com suspeita da presença de fungos do tipo dermatófito sendo mais comuns os do gênero *Microsporum canis* e swab de secreção do conduto auditivo quase sempre com o resultado positivo para leveduras do gênero *Malassezia* sp.

3.5.1 Cultura de fungos Dermatófitos

Existem três gêneros de fungos dermatófitos *Microsporum* (*M. audouinii*, *M. canis*, *M. gypseum*.), *Trichophyton* (*T. tonsurans*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* e *T. schoenleinii*.) e *Epidermophyton* (*E. floccosum*.), sendo o *Microsporum canis* o mais comum encontrado na rotina do laboratório. Eles vivem em condições normais no solo, mas em certos desequilíbrios podem parasitar os animais e seres humanos. Apresentam biotropismo por tecidos e estruturas queratinizadas como pelos, unhas e pele, causando a dermatofitose, que é uma micose superficial (MEDEIROS et al, 2009).

Para o crescimento desse tipo de fungo utiliza-se o ágar micobiótico® identificando-se a placa com a data, nome do animal e o número da página onde estão os dados do paciente na ata de atividades fúngicas. Espalham-se os pelos sobre o ágar aderindo-os ao meio de cultura com o auxílio de uma pinça previamente flambada na chama do bico de Bunsen e resfriada. Aguarda-se aproximadamente 15 a 21 dias para averiguar o crescimento desses fungos para visualização em lâmina. A figura 29 evidencia o crescimento característico de fungos dermatófitos *Microsporum canis* em placa de ágar Micobiótico®.



Figura 29 - Cultura de fungo Dermatófito da espécie *Microsporum canis* em Ágar micobiótico®.

Fonte: Arquivo pessoal/ Luciane Sardinha.

Para visualização microscópica, deve-se observar uma lâmina contendo o fungo. Para o preparo dessa lâmina deve-se adicionar à lâmina de vidro uma gota de corante Azul de Algodão de Lactofenol ou Azul de Metileno promove-se a aderência de uma fita adesiva transparente contendo os fungos cultivados na placa depois de aderidos na fita com o auxílio de uma pinça previamente flambada e resfriada. A lâmina pode ser observada ao microscópio óptico com mostrado na figura 30 em que estão evidentes fungos da espécie *Microsporum canis* em um aumento de 400 vezes.

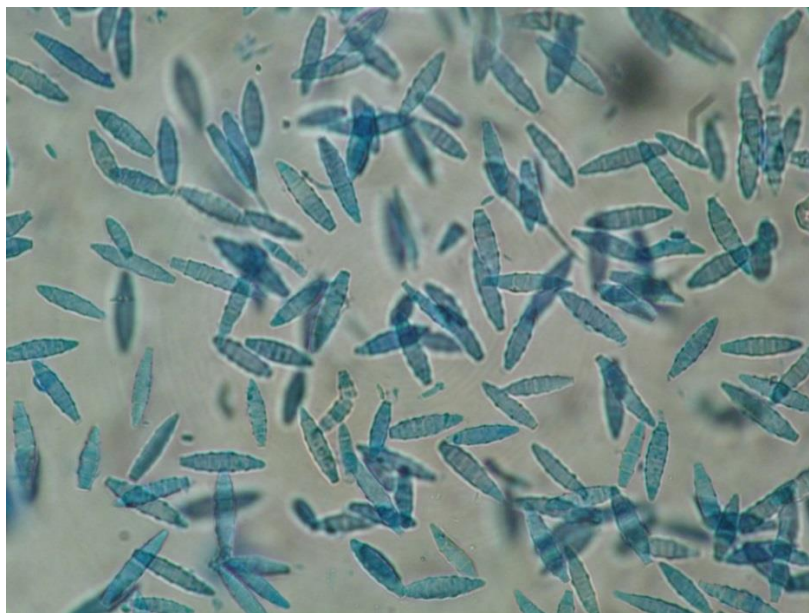


Figura 30 - Fungo *Microsporium canis* observado ao microscópio óptico no aumento de 400 vezes.

Fonte: Arquivo pessoal/ Luciane Sardinha.

3.5.2. Cultura para isolamento e identificação de leveduras do gênero *Malassezia* spp

Geralmente, as amostras de secreção de ouvido são cultivadas em ágar Sabouraud®, que é um meio ideal para o crescimento de leveduras, pois a casuística da presença de *Malassezia* spp nessas amostras é de quase cem por cento.

A cultura é realizada passando o swab com o conteúdo sobre o ágar promovendo estriações e posterior identificação na tampa da placa de Petri com nome do animal, data e o número da página na ata onde estão os dados referentes ao paciente, deve-se aguardar o crescimento em estufa a 37°C por até sete dias. Após o crescimento nesse meio, a visualização é feita em lâmina no microscópio óptico com o mesmo procedimento de coloração de Gram. Ao microscópio a *Malassezia* spp é vista e conhecida popularmente como “sapatinhos de bailarina”.

A *Malassezia* spp é um fungo leveduriforme pertencente à microbiota normal podendo ser encontrado no reto, pele interdigital, sacos anais e vagina mas que pode gerar infecções oportunistas no meato acústico externo e tegumento de cães e gatos causando dermatite e otite externa.(MARTINS et al, 2004). A figura 31 mostra uma identificação de *Malassezia* sp em lâmina com coloração de Gram em microscopia óptica em um aumento de mil vezes o tamanho original.

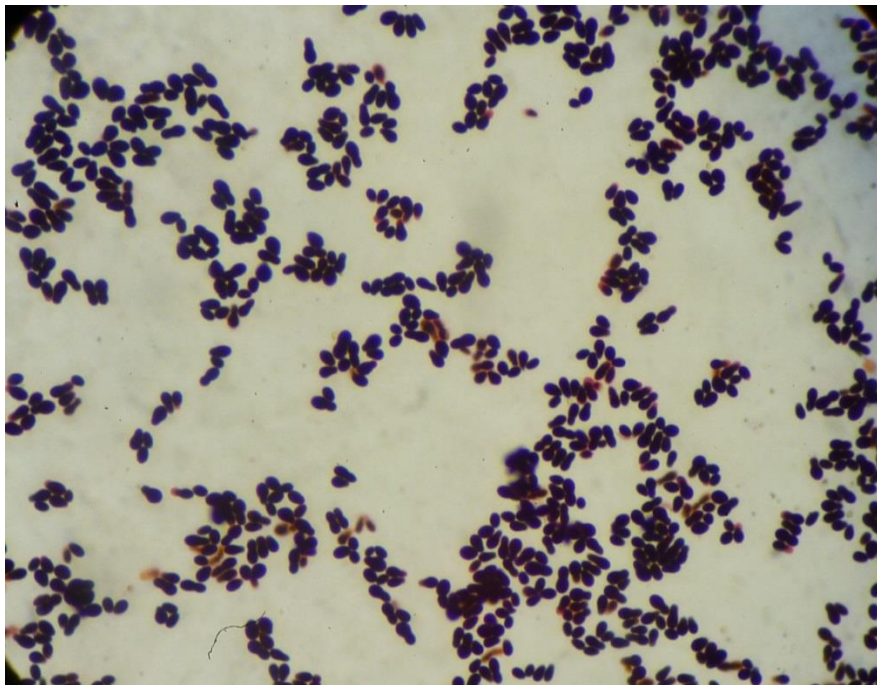


Figura 31 – Leveduras do gênero *Malassezia* sp vista em lâmina corada pelo método de coloração de Gram em microscopia óptica com um aumento de 1000 vezes.

Fonte: Arquivo pessoal/ Luciane Sardinha.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises microbiológicas acompanhadas e realizadas no laboratório foram satisfatórias para se ter uma noção da frequência e do comportamento relacionado ao crescimento e características físicas e bioquímicas de determinados microrganismos mais comuns que representam um problema à saúde animal.

Foi possível se observar que é necessário um conhecimento teórico prévio sobre as características dos agentes patogênicos para que haja um direcionamento eficiente e um diagnóstico rápido e eficaz, o que pode ser adquirido também com a prática na rotina e auxílio da literatura ampla disponível no laboratório.

O período de estágio curricular realizado no laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da Universidade de Brasília foi de grande relevância, possibilitando um aprendizado prático na área de diagnóstico microbiológico. A realização e acompanhamento dos testes foram essenciais para um aprofundamento do conhecimento de tais análises, bem como do comportamento adequado em um laboratório de biossegurança, sempre contando com o auxílio de uma equipe profissional treinada e comprometida com o resultado de suas pesquisas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BD. INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO – MEIOS EM PLACAS PRONTOS A USAR. 2003. disponível no site: www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/PA/PT-PA-254417.pdf.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos.** Módulo 4. disponível no site http://www.anvisa.gov.br/servicos/audite/manuals/microbiologia/mod_4_2004.pdf

FILHO, GERMANO NUNES SILVA; DE OLIVEIRA, VETÚRIA LOPES. **Microbiologia Manual de Aulas Práticas.** Segunda edição. UFSC. Florianópolis, 2007.

KONEMAN, ELMER W; ALLEN, STEPHEN D; JANDA, WILLIAM M; SCHRECKENBERGER, PAUL C; WINN, WASHINGTON C, JR. **Diagnóstico Microbiológico Texto e Atlas colorido.** Quinta edição. Medsi, 2001.

MARTINS, A. A.; ROSA, C. S.; NASCENTE, P. S.; SOUZA, L. L.; SANTOS, D. V.; FARIA, R. O.; MEIRELES, M. C. A. **Utilização dos Tweens 20, 40, 60 e 80 para identificação das espécies do gênero *Malassezia*.**

MEDEIROS, FABRÍCIA; CREPALDI, NADYNE; TOGNOLI, LUIZA; PEREIRA R.E.P. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária. Ano VII. Nº 12. 2009.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZZOTIES (OIE). **Manual of standards for diagnostic tests and vaccines.** 2000. 5ª edição. Paris. Disponível em http://www.oie.int/normes/mmanual/A_00023htm.

OLIVEIRA, SÉRGIO J. **Microbiologia Veterinária Guia Bacteriológico prático.** Segunda edição. ULBRA. Canoas, 2000.

OXOID.MANUAL OXOID. Primeira edição (português). 2000.

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

QUINN, P.J; MARKEY, B.K; CARTER, M.E; DONNELLY, W.J; LEONARD, F.C.
Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas. Editora ARTMED. Porto Alegre,
2005.

BECTON DICKINSON (BD). **ÁGAR EMB (Eosin Methylene Blue)**. 2013. Disponível no site:
www.biomedicinapadiao.com/2013/02/agar-emb-eosin-methylene-blue.html.