



MICROBIOLOGIA CLÍNICA PARA O CONTROLE DE INFECÇÃO RELACIONADA À ASSISTÊNCIA À SAÚDE

Módulo 5: Tecnologias em Serviços de Saúde: Descrição dos
Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos



MICROBIOLOGIA CLÍNICA PARA O CONTROLE DE INFECÇÃO RELACIONADA À ASSISTÊNCIA À SAÚDE

Módulo 5: Tecnologia em Serviços de
Saúde: Descrição dos Meios de Cultura
Empregados nos Exames Microbiológicos

Copyright © 2013 Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Todos os direitos reservados. É permitida a reprodução parcial ou total dessa obra, desde que citada a fonte e que não seja para venda ou qualquer fim comercial.

A responsabilidade pelos direitos autorais de textos e imagens dessa obra é da área técnica.

A Anvisa, igualmente, não se responsabiliza pelas idéias contidas nessa publicação.

1ª edição – 2010

Elaboração, distribuição e informações:

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA

SIA Trecho 5, Área Especial 57

CEP: 71205-050 Brasília – DF

Tel.: (61) 3462-6000

Home page: www.anvisa.gov.br

Diretoria

Dirceu Brás Aparecido Barbano – Diretor-Presidente

Jaime Cesar de Moura Oliveira

José Agenor Álvares da Silva

Adjuntos de Diretor

Luiz Roberto Klassmann

Luciana Shimizu Takara

Neilton Araujo de Oliveira

Doriane Patricia Ferraz de Souza

Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde – GGTES

Diana Carmem Almeida Nunes de Oliveira

Gerência de Vigilância e Monitoramento em Serviços de Saúde – GVIMS

Magda Machado de Miranda Costa

Coordenação Técnica:

Ana Clara Ribeiro Bello dos Santos – Anvisa

Carlos Emílio Levy – Universidade de Campinas-SP

Redação:

Julia Taeko Utiyama Yoshida – Instituto Adolfo Lutz (IAL)-SP

Maria Carmen Gonçalves Lopes – Centro Infantil Boldrini-SP

Rosângela Aparecida Mendes Silva – Centro Infantil Boldrini-SP

Revisão técnica – Anvisa:

André Anderson Carvalho

Fabiana Cristina de Sousa

Heiko Thereza Santana

Magda Machado de Miranda

Suzie Marie Gomes

Cooperação técnica:

Termo de Cooperação nº 64

Organização Pan-Americana da Saúde

Organização Mundial da Saúde

Representação Brasil

Joaquin Molina – Representante

Enrique Vazquez – Coordenador da Unidade Técnica de Doenças

Transmissíveis e Não-Transmissíveis e Análise de Situação de Saúde

Rogério da Silva Lima – Consultor Nacional da Unidade Técnica de

Doenças Transmissíveis e Não-Transmissíveis e Análise de Situação

de Saúde

Projeto Gráfico e Diagramação:

All Type Assessoria Editorial Ltda

Capa:

Camila Contarato Burns – Anvisa

Ficha Catalográfica

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 5 :Tecnologias em Serviços de Saúde: descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos/Agência Nacional de Vigilância Sanitária.– Brasília: Anvisa, 2013.

95p.: il.9 volumes

ISBN

1. Infecção Relacionada à Assistência à Saúde – Controle. 2. Infecção em Serviços de Saúde. 3. Microbiologia Clínica. 4. Vigilância Sanitária em Serviços de Saúde. 5. Resistência microbiana. I. Título.

SUMÁRIO

Apresentação	5
Introdução	7
1.1 Procedimentos gerais para preparação e distribuição de meios de cultura.	7
1.2 Controle de qualidade de esterilidade e crescimento	8
1.3 Recomendações gerais	9
Capítulo 1: Meios de Cultura para Transporte e Conservação	11
1.1 Cary Blair	11
1.2 Salina tamponada.....	12
1.3 Meio Stuart	13
1.4 Ágar nutriente	14
Capítulo 2: Meios para Crescimento e Isolamento	17
2.1 Ágar chocolate	17
2.2 Ágar Thayer-Martin chocolate	19
2.3 Ágar Salmonella-shigella (SS)	20
2.4 Caldo selenito com novobiocina	22
2.5 Caldo tetracionato.....	23
2.6 Meio de Tioglicolato com indicador	25
2.7 Meio de Tioglicolato sem indicador	26
2.8 Ágar Mac Conkey	27
2.9 Ágar sangue	28
2.10 Ágar Cled – Cystine Lactose Electrolyte Deficient	30
2.11 Caldo BHI – Brain Heart Infusion	31
2.12 Löwenstein Jensen	33
2.13 Meio bifásico: Löwenstein e Middlebrook	35
2.14 Ágar Mycosel	37
2.15 Ágar Sabouraud Dextrose	38
Capítulo 3: Meios Comerciais para Provas de Identificação	41
3.1 Base de nitrogênio para leveduras – Yeast Nitrogen Base	41
3.2 Ágar Citrato Simmons	43
3.3 Ágar Bile-Esculina	45
3.4 Ágar Sangue – CAMP	46
3.5 Caldo Base de Moeller	48
3.6 Ágar Dnase	50
3.7 Ágar Esculina	52
3.8 Ágar Fenilalanina.....	54

3.9	CTA – Cystine Trypticase Ágar	55
3.10	Caldo Triptona e SIM	57
3.11	Caldo Malonato	60
3.12	Caldo Nitrato	61
3.13	Meio Base Para Oxidação e Fermentação – OF	63
3.14	M.E.V.A.G. (Milieu pour l'étude de la voie d'attaque des glucides – Hugh & Leifson, 1953)	66
3.15	Ágar TSI – Triplo Açúcar Ferro	67
3.16	Ágar Base Uréia (Christensen)	69

Capítulo 4: Produtos para Provas de Identificação 71

4.1	Prova de catalase	71
4.2	Prova de coagulase	72
4.3	Prova de gelatinase	74
4.4	Prova de Lecitinase	75
4.5	Prova de oxidase	77
4.6	Fermentação de carboidratos	79
4.7	Prova PYR	80
4.8	Crescimento a 42 E 44°C	82
4.9	Teste de motilidade	83
4.10	Prova de tolerância ao NaCl 6,5%	89

Capítulo 5: Discos para Identificação 91

5.1	Bacitracina	91
5.2	Novobiocina	92
5.3	Optoquina	93
	Referências Bibliográficas	95

APRESENTAÇÃO

A resistência microbiana é um grave problema mundial, estando associada ao aumento do tempo de internação, dos custos do tratamento e das taxas de morbidade e mortalidade dos pacientes. O uso indiscriminado e incorreto dos antimicrobianos na comunidade e no ambiente hospitalar é reconhecidamente um importante fator de risco para o aparecimento e a disseminação da resistência microbiana.

Nesse contexto, insere-se o Laboratório de Microbiologia, que tem como objetivo não apenas apontar o responsável por um determinado estado infeccioso, mas também indicar, através do monitoramento de populações microbianas, qual o perfil dos micro-organismos que estão interagindo com o organismo humano, possibilitando a indicação de tratamentos mais adequados. Para o desempenho satisfatório dessa função, é fundamental que os laboratórios de microbiologia possuam estrutura capaz de estabelecer informações sobre a melhor amostra biológica, reconhecer a microbiota e os contaminantes, identificar micro-organismos associados à infecção ou com propósitos epidemiológicos, obter resultados rápidos em casos de emergência, realizar o transporte rápido das amostras e manter uma educação contínua em relação aos aspectos da infecção relacionada à assistência à saúde.

Tendo em vista esses aspectos e considerando que a microbiologia é um campo muito dinâmico, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa, em cooperação com a Organização Pan-Americana da Saúde – OPAS, propõe a terceira revisão do Manual de Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde, buscando atualizar informações nos temas considerados essenciais e contando com um seleto e conceituado corpo editorial. O manual é composto por nove módulos, a saber: Módulo 1 – Biossegurança e manutenção de equipamentos em laboratório de microbiologia clínica; Módulo 2 – Controle externo da qualidade; Módulo 3 – Principais Síndromes Infecciosas; Módulo 4 – Procedimentos laboratoriais: da requisição do exame à análise microbiológica e laudo final; Módulo 5 – Tecnologias em Serviços de Saúde: descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos; Módulo 6 – Detecção e identificação de bactérias de importância médica; Módulo 7 – Detecção e identificação de micobactérias de importância médica; Módulo 8 – Detecção e identificação de fungos de importância médica e Módulo 9 – Infecções virais.

A Anvisa e a OPAS esperam com essa publicação contribuir para que os laboratórios de microbiologia possam assimilar e alcançar novos níveis de complexidade laboratorial, atendendo às exigências e características próprias de cada unidade hospitalar, além de subsidiar a adoção de procedimentos básicos padronizados nesses serviços.



1.1 Procedimentos gerais para preparação e distribuição de meios de cultura

- Usar EPIs para o preparo de meios de cultura (máscaras, jaleco de manga longa e touca).
- Observar os riscos indicados nos rótulos dos frascos de meios de culturas e de reagentes químicos e fazer uso de EPIs específicos (máscaras, óculos de proteção e luvas).
- Usar vidrarias limpas, secas e sem trincos ou defeitos. Utilizar vidraria (balão de fundo chato, Placa de Petri, tubo de ensaio, frasco, pipeta e outras Vidrarias auxiliares) em vidro neutro temperado, termo resistente com parede uniforme e reforçado.
- Esterilizar a vidraria pelo processo de calor seco (forno Pasteur) 170°C por 120 minutos ou 180°C por 60 minutos.
- Usar água destilada, deionizada, ou produzida por osmose reversa na preparação de meios de cultura e soluções.
- Os meios comerciais devem ser hidratados em pequena quantidade de água até que todo o meio fique úmido e só depois deve-se acrescentar o restante da água.
- Os meios comerciais e preparados não comerciais devem ser pesados separadamente em papel manteiga e adicionados em uma vidraria adequada, hidratar em pequena quantidade de água até que todo o meio fique úmido. Agitar firmemente por alguns segundos até obter uma suspensão homogênea. Escorrer o restante da água pela parede para retirar qualquer material aderente.
- Ajustar o pH dos meios preparados não comerciais com solução de HCl e NaOH 0,1N ou 1N. Nos meios contendo Ágar, pesar o Ágar separadamente e acrescentar após o ajuste do pH para não obstruir o eletrodo. O pH dos meios comerciais, normalmente, não precisa ser reajustado mas deve ser verificado a cada lote.
- Dissolver os meios líquidos e soluções com agitação e leve aquecimento (não abrir fervura).

- Aquecer os meios contendo Ágar até ferver com constante agitação. A parede da vidraria deve estar lisa sem pontos de Ágar. Caso observe pontos, a fervura não foi suficiente para a total dissolução. Retornar ao fogo para finalizar o procedimento.
- Sempre que for necessário o aquecimento dos meios, usar vidro termo resistente tipo Pyrex e aquecer sobre a tela de amianto ou similar e tripé, no bico de Bunsen ou em placa aquecedora.
- Usar sempre luvas térmicas apropriadas para laboratório para manipular vidrarias quentes.
- Normalmente, quando for usado o termo “esterilizar em autoclave”, o tempo de esterilização é de 15 minutos e a temperatura de 121°C. Observar as recomendações contidas no rótulo ou manual do fabricante.
- Sempre que for usado o termo “esterilizar por filtração”, usar membrana composta por ésteres de celulose ou polímeros plásticos e com porosidade de 0,22µm de diâmetro, recomendado para reter partículas bacterianas. A esterilização por filtração é utilizada quando o material é sensível ao calor, como alguns meios de cultura, soluções de açúcares, soluções de antibióticos e outros.
- Quando distribuir o meio antes de autoclavar, os tubos não precisam estar esterilizados.
- Quando distribuir o meio após a autoclavação, os tubos, frascos, placas, pipetas e vidrarias ou materiais auxiliares obrigatoriamente devem ser estéreis.
- Os meios devem ser autoclavados com as tampas semiabertas, para que a esterilização seja por igual em todo o conteúdo dos tubos. Tampas fechadas não permitem a entrada do vapor.

1.2 Controle de qualidade de esterilidade e crescimento

- Avaliar sistematicamente os meios de culturas e soluções quanto à qualidade de crescimento, seletividade, checagem de características bioquímicas diferenciais e características físicas.
- Para todos os meios confeccionados, colocar no mínimo 10% do lote preparado na estufa 35 ± 1°C por 24 horas para o controle de esterilidade.
- Não deve haver mudança de cor nem crescimento de qualquer colônia.
- Para o controle de crescimento, sempre que possível usar cepas ATCC, que são cepas de referências de origem e padrão definido de provas para a sua caracterização.
- Usar cepas de micro-organismos de referência obtidas diretamente de uma coleção nacional ou internacional reconhecida ou culturas comerciais com propriedades equivalentes comprovadas para avaliação de desempenho dos meios de cultura e de outras soluções preparadas no laboratório.
- Manter instrução de manutenção e preparo de cultura de trabalho no laboratório. (consultar ISO 11133-1 anexo B – guia de preservação e manutenção de cultura de referência).

- Controlar a eficácia da autoclave ou estufa, realizando semanalmente teste biológicos para essa finalidade. Os testes biológicos para autoclaves a vapor são os que contêm 10^6 *Geobacillus stearothermophilus* e os testes biológicos para estufa de calor seco contêm 10^6 *Bacillus subtilis*.

1.3 Recomendações gerais

- Não usar meios prontos para uso em tubos ou placas que estejam ressecados ou vencidos.
- A validade dos meios preparados, mantidos nas condições definidas de armazenamento, deve ser determinada e controlada.
- Observar com atenção para as instruções dos rótulos pois, dependendo do fabricante, podem ter o mesmo nome, mas composição diferente e portanto ser diferente a quantidade de meio a ser usada.
- Recomenda-se o uso de tubos com tampa de rosca, pois evitam o ressecamento rápido do meio (tamanho dos tubos utilizados geralmente são de 10X100 mm, 16x150mm e 20x150mm). A validade citada nesse documento é indicada para meios de cultura distribuídos em tubos com tampa de rosca.
- As placas de Petri são de 50, 90 ou 150 mm de diâmetro.
- Todos os meios confeccionados devem ser devidamente identificados com o nome, data de fabricação, número de lote interno do laboratório, data de validade e tipo de armazenamento.
- Todos os meios em placa devem ser embalados na posição invertida e em pacote de filme plástico PVC transparente e de papel grau cirúrgico para evitar o ressecamento.
- Evitar o uso de sacos plásticos para embalar as placas, pois a água de condensação formada facilita a proliferação de fungos; para meios de cultura em tubos, colocar em sacos plásticos, procurando tirar o excesso de ar.



Capítulo 1:

Meios de Cultura para Transporte e Conservação

*Rosângela Aparecida Mendes Silva
Maria Carmen Gonçalves Lopes
Julia Taeko Utiyama Yoshida*

1.1 Cary Blair

1.1.1 Princípio

- Meio de Cary Blair foi formulado a partir do meio de Stuart, uma vez que micro-organismos patogênicos e outros coliformes fecais sobrevivem bem nesse meio.
- A carência de uma fonte de nitrogênio impede consideravelmente a multiplicação de micro-organismos e a composição nutritiva garante a sobrevivência deles.
- O que difere esse meio do meio de Stuart é a adição de uma solução salina balanceada de tampão fosfato inorgânico e a retirada da fórmula o azul de metileno.

1.1.2 Utilidade

- Transporte de material fecal e consequente conservação dos micro-organismos.

1.1.3 Fórmula/produto

- Meio comercial: Meio de transporte Cary Blair.

1.1.4 Procedimentos

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante.
- Fundir completamente.
- Distribuir 7 mL por tubo.
- Esterilizar em autoclave.
- Após retirar da autoclave, manter os tubos em posição vertical para solidificar.
- pH: 8,0 +/- 0,5 (BBL) (25°C).

1.1.5 Controle de qualidade

- Crescimento bom (com, 24 e 48 horas de crescimento): *Shigella flexnerii* ATCC 12022.

1.1.6 Conservação e validade

- Conservar de 4 a 10°C de 6 a 8 semanas.

1.1.7 Inoculação

- Introduzir um *swab* estéril de madeira nas fezes recém-coletadas.
- Após a coleta, introduzir imediatamente o *swab* no meio de cultura e quebrar a ponta da haste, de modo que a parte que contém o algodão fique no meio de cultura.
- Fechar o tubo.
- Manter em temperatura ambiente até o momento de semear nos meios seletivos adequados.

1.1.8 Interpretação

- Cor original do meio: Branco opalescente.
- Como esse é um meio de transporte, não há evidência de crescimento bacteriano.

1.1.9 Recomendações

- Não deixar o meio com a tampa aberta ou semiaberta após a semeadura.
- Não semear fezes coletadas com mais de 6 horas.

1.2 Salina tamponada

1.2.1 Princípio

- Meio líquido tamponado que mantém a bactéria viável.

1.2.2 Utilidade

- Meio de transporte de fezes.

1.2.3 Fórmula/produto

- Fórmula:
 - NaCl 4,2 g.
 - Fosfato dipotássico anidro 3,1 g.
 - Glicerina bidestilada 300 mL.
 - Água destilada 700 mL.

1.2.4 Procedimentos

- Distribuir 10 mL em cada tubo de 16 x 160 mm.

- Esterilizar em autoclave.

1.2.5 Controle de qualidade

- *Shigella flexneri* ATCC 12022.

1.2.6 Inoculação

- Inocular 2 g da amostra de fezes e homogeneizar.
- Incubar a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 12 a 18 horas.

1.2.7 Interpretação

- O crescimento é indicado pela turbidez do meio.
- Após incubação semear 3 a 4 alçadas da amostra em uma placa de SS e/ou MacConkey.

1.2.8 Conservação e validade

- Conservar de 4 a 8°C por até 3 meses.

1.3 Meio Stuart

1.3.1 Princípio

- A carência de uma fonte de nitrogênio impede consideravelmente a multiplicação de micro-organismos e a composição nutritiva garante a sobrevivência deles.

1.3.2 Utilidade

- Transporte de diversos materiais e consequente conservação dos micro-organismos.
- Conservação de micro-organismos patogênicos como: *Haemophilus* spp., *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. entre outros.

1.3.3 Fórmula/produto

- Meio comercial: Meio de transporte STUART.

1.3.4 Procedimentos

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante.
- Fundir completamente.
- Distribuir 7 mL por tubo.
- Esterilizar em autoclave.
- Após retirar da autoclave, manter os tubos em posição vertical para que solidifiquem.
- pH: 7,4 +/- 0,2 (25°C).

1.3.5 Controle de qualidade

- Crescimento bom (com, 24 e 48 horas de crescimento):
 - *Haemophilus influenzae* ATCC 10211
 - *Shigella flexneri* ATCC 12022
 - *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305
 - *Bordetella pertussis* ATCC 9340

1.3.6 Conservação e validade

- Conservar embalado de 4 a 8°C por 1 a 2 semanas.

1.3.7 Inoculação

- O material biológico deve ser coletado com auxílio de um *swab* estéril com haste de madeira.
- Após a coleta, introduzir imediatamente o *swab* no meio de cultura e quebrar a ponta da haste, de modo que a parte que contém o algodão fique no meio de cultura.
- Fechar o tubo.
- Manter em temperatura ambiente até o momento de semear nos meios seletivos adequados.

1.3.8 Interpretação

- Cor original do meio: Branco opalescente.
- Como esse é um meio de transporte, não há evidência de crescimento bacteriano.

1.3.9 Recomendações

- Não deixar o meio com a tampa aberta ou semiaberta após a semeadura.

1.4 Ágar nutriente

1.4.1 Princípio

- O Ágar Nutriente é um meio relativamente simples, de fácil preparação e barato, muito usado nos procedimentos do laboratório de Microbiologia.

1.4.2 Utilidade

- Ágar Nutriente tem várias aplicações no laboratório de Microbiologia, e pode ser utilizado para análise de água, alimentos e leite como meio para cultivo preliminar das amostras submetidas a exames bacteriológicos e isolamento de organismos para culturas puras.
- Uso mais frequente é para a conservação e manutenção de culturas em temperatura ambiente nesse Ágar, como método opcional para os labo-

ratórios que não dispõem do método da crio conservação (congelamento das cepas em freezer à - 70°C).

- Usado para observar esporulação de espécies de bacilos Gram-positivos.

1.4.3 Fórmula/produto

- Produto comercial: Nutriente Ágar
- Fórmula:
 - Extrato de carne 3 g
 - Peptona 5 g
 - Ágar 15 g
 - Água destilada 1000 mL
 - pH: 6,8 +/- 0,2 (25°C)

1.4.4 Procedimentos

- Pesar e hidratar os componentes.
- Fundir.
- Distribuir 3-5 mL por tubo.
- Esterilizar em autoclave.
- Após retirar da autoclave, inclinar os tubos ainda quentes para que solidifiquem com a superfície em forma de “bico de flauta” (ângulo de 45°).

1.4.5 Controle de qualidade

- Crescimento bom a excelente:
 - *Escherichia coli* ATCC 25922
 - *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305

1.4.6 Conservação e validade

- Conservar embalado de 4 a 8°C por até 3 meses.

1.4.7 Inoculação

- Estriar a superfície inclinada do meio.
- Incubar.

1.4.8 Interpretação

- Cor original do meio: branco opalescente.
- Positivo: Crescimento na superfície do Ágar.
- Negativo: por ser um meio geral, não cabe fazer controle negativo.

1.4.9 Recomendações

- Por ser um meio nutritivo, a ausência de crescimento não deverá ocorrer.



Capítulo 2: Meios para Crescimento e Isolamento

*Rosângela Aparecida Mendes Silva
Maria Carmen Gonçalves Lopes
Julia Taeko Utiyama Yoshida*

2.1 Ágar chocolate

2.1.1 Princípio

- Meio de Ágar Chocolate é amplamente utilizado para o cultivo de micro-organismos exigentes, embora cresçam nesse meio quase todos os tipos de micro-organismos.
- À base do meio é adicionado sangue de cavalo, carneiro ou coelho e levado para “achocolatar” em banho-maria a 80-85°C por 15 minutos, o que faz com que as hemácias lisem, liberando hemina e hematina, compostos fundamentais para o crescimento dos micro-organismos exigentes.

Observação: se utilizar sangue de carneiro ou coelho no lugar do sangue de cavalo, resfriar a base “achocolatada” a aproximadamente 50°C e adicionar os suplementos à base de NAD (coenzima I) e cisteína.

2.1.2 Utilidade

- Crescimento de micro-organismos exigentes *Haemophilus* spp., *Neisseria* spp., *Branhamella catarrhalis* e *Moraxella* spp.

2.1.3 Fórmula/produto

- Meios comerciais: BHI Ágar *, Columbia Ágar Base, Blood Ágar Base, Mueller Hinton Ágar.
- Sangue de cavalo, carneiro ou coelho desfibrinado.
- Recomenda-se o uso da base de BHI Ágar, por apresentar melhor crescimento das cepas exigentes, principalmente cepas de *Haemophilus* spp.

2.1.4 Procedimentos

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante.
- Esterilizar em autoclave.
- Esfriar a base à temperatura de aproximadamente 80°C.
- Adicionar 5-10 mL de sangue desfibrinado de cavalo para cada 100 mL de base; Recomenda-se, conforme o micro-organismo, Ágar BHI chocolate 10% sangue de cavalo, Ágar Muller Hinton chocolate 5% sangue de coelho/carneiro/cavalo e Ágar chocolate 5% sangue de carneiro com base de Ágar comum.
- Levar para achocolatar em banho-maria a 80-85°C por 15 minutos. Homogeneizar constantemente até lisar totalmente as hemácias e o meio apresentar uma cor castanho escuro (chocolate).
- Distribuir aproximadamente 20mL em placas de Petri estéril de 90 mm de diâmetro ou 6mL em tubo estéril 16x160mm e inclinar os tubos ainda quentes para que solidifiquem com a superfície em forma de “bico de flauta” (ângulo de 45°).

2.1.5 Controle de qualidade

- Crescimento bom a excelente: *Haemophilus influenzae* ATCC 10211.

2.1.6 Conservação e validade

- Conservar de 4 a 10°C por 3 meses (tubos) e 1 mês (placas).

2.1.7 Inoculação

- Estriar a superfície do meio, usando a técnica de semeadura para isolamento.
- Incubar a 35°C por 24 horas.

2.1.8 Interpretação

- Cor original do meio: castanho escuro (chocolate).
- Colônias de tamanho pequeno a médio, com pigmento amarelo: sugestivo de *Neisseria* spp., *Branhamella catarrhalis* ou *Moraxella* spp.
- Colônias pequenas e delicadas, com pigmento creme claro: sugestivo de *Haemophilus* spp.

2.1.9 Recomendações

- Lembrar que é um meio rico e crescem vários tipos de micro-organismos.
- Fazer esfregaço de todas as colônias suspeitas e corar pela técnica de Gram, para confirmar se trata ou não de *Neisseria* spp., *Branhamella catarrhalis* ou *Moraxella* spp. (cocos Gram-negativos reniformes) ou *Haemophilus* spp. (bacilos Gram-negativos delicados e pleomórficos).
- Não usar sangue desfibrinado vencido.

- Por ser um meio rico, o crescimento a partir de materiais biológicos em geral costuma ser abundante. Sempre que necessário, isolar a colônia em estudo para os procedimentos de identificação, para não correr o risco de trabalhar com cepas misturadas.

2.2 Ágar Thayer-Martin chocolate

2.2.1 Princípio

- É um meio rico e superior a outros meios de cultivo destinados para o isolamento de *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis*, pois contém em sua fórmula antibióticos que inibem o crescimento de bactérias do gênero *Neisseria* saprófitas e outras bactérias, quando em amostras colhidas de sítios contaminados.

2.2.2 Utilidade

- Usado para o isolamento seletivo de *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis*, a partir do material de investigação.

2.2.3 Fórmula/produto

- Meio comercial: Thayer-Martin Ágar Base.
- Sangue desfibrinado de carneiro.
- Suplemento I: mistura de inibidores (antibióticos VCN ou VCNT).
- Suplemento II: mistura de fatores de crescimento.

2.2.4 Procedimentos

- Dissolver os suplementos liofilizados conforme instruções do fabricante com o diluente que acompanha o suplemento e reservar.
- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante (normalmente prepara-se 250mL de base para cada frasco de suplementos I e II); existe no mercado frasco de suplemento para 500mL de base.
- Esterilizar a base em autoclave.
- Esfriar a base a 80°C.
- Adicionar 5 mL de sangue desfibrinado de carneiro para cada 100 mL de base.
- Levar para achocolatar em banho-maria a 80-85°C por 15 minutos. Homogeneizar constantemente. Homogeneizar bem até lisar totalmente as hemácias e o meio apresentar uma cor castanho escura (chocolate).
- Deixar resfriar a base a 50°C.
- Adicionar assepticamente à base resfriada os suplementos previamente dissolvidos.
- Homogeneizar delicadamente para não formar bolhas.

- Distribuir 20-25mL em placas de Petri estéril de 90 mm ou 4mL em tubo e inclinar para a superfície ficar em forma de “bico de flauta” (ângulo de 45°). pH: 7,2 +/- 0,2.

2.2.5 Controle de qualidade

- Positivo: *Neisseria gonorrhoeae* 43069 e *Neisseria meningitidis* 13090.
- Negativo: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

2.2.6 Conservação e validade

- Conservar embalado de 4 a 8°C por até 3 meses (tubos) e 1 mês (placas).

2.2.7 Inoculação

- Usar a técnica de semeadura por esgotamento.
- Incubar em CO₂ e umidade (jarra com vela acesa e um chumaço de algodão embebido em água).
- Incubação por 48 horas.

2.2.8 Interpretação

- Cor original do meio: castanho escuro (chocolate).
- Colônias pequenas com pigmento creme: sugestivo de *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis*.
- Fazer esfregaço de todas as colônias suspeitas e corar pela técnica de Gram, para confirmar se trata ou não de *Neisseria* (diplococos Gram-negativos reniformes).
- Confirmando a morfologia pelo Gram, seguir identificação com testes de oxidase e provas de fermentação.

2.2.9 Recomendações

- Antes de semear o material biológico aquecer o meio de cultura em estufa à 35°C, pois temperaturas baixas podem inibir o crescimento de *Neisseria*.
- Não usar meio, suplementos e sangue vencidos.
- Se não for incubado em CO₂ e não houver crescimento, pode ser um resultado falso-negativo, pois bactérias do gênero *Neisseria* necessitam de atmosfera com o CO₂ para o crescimento.
- Se não houver crescimento, incubar até 5 dias.

2.3 Ágar Salmonella-shigella (SS)

2.3.1 Princípio

- Ágar SS possui componentes (sais de bile, verde brilhante e citrato de sódio) que inibem micro-organismos Gram-positivos.

- A incorporação de lactose ao meio permite diferenciar se o micro-organismo é lactose positiva (bactérias que fermentam a lactose produzem ácido que na presença do indicador vermelho neutro resultando na formação de colônias de cor rosa), e bactérias que não fermentam a lactose formam colônias transparentes.
- Tiosulfato de sódio e o citrato férrico permitem a detecção de H₂S evidenciado por formação de colônias de cor negra no centro.

2.3.2 Utilidade

- Selecionar e isolar espécies de *Salmonella* e *Shigella*, em amostras de fezes, alimentos e água.

2.3.3 Fórmula/produto

- Meio comercial: Ágar SS.

2.3.4 Procedimentos

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante.
- Aquecer o meio até fundir o Ágar.
- **Não autoclavar** – Este meio não precisa ser esterilizado.
- Resfriar até 50°C e distribuir 20 a 25 mL em placas de Petri 90 mm estéreis.
- Deixar em temperatura ambiente até resfriar; pH: 7,0 +/-0,2 (25°C).
- Embalar as placas com plástico PVC transparente e guardar em geladeira de 4 a 8°C.

2.3.5 Controle de qualidade

- Positivo: *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.
- Negativo: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

2.3.6 Inoculação

- Inocular as placas e incubar por 18 a 24 horas.
- Se negativo após 24 horas, reincubar por mais 24 horas.

2.3.7 Interpretação

- Cor original do meio: vermelho alaranjado.
- Colônias com centro negro (H₂S) ou colônias incolores: suspeita de *Salmonella*.
- Colônias incolores: suspeita de *Shigella* spp.
- Colônias cor de rosa ou vermelho: suspeita de *Escherichia coli* ou *Klebsiella* spp.
- As bactérias não fermentadoras de lactose são incolores.
- As bactérias fermentadoras de lactose aparecem na cor rosa.

2.3.8 Conservação e validade

- Conservar embalado de 4 a 8°C por 1 mês.

2.3.9 Recomendações

- Ausência de crescimento ou crescimento escasso, reincubar a placa mais 24 horas.
- Não autoclavar, pois a alta temperatura degrada o açúcar contido no meio.

2.4 Caldo selenito com novobiocina

2.4.1 Princípio

- Possui propriedades que inibem coliformes e outras espécies da flora intestinal como estreptococos.

2.4.2 Utilidade

- Utilizado para o enriquecimento e isolamento de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. em amostras de fezes, urina e alimentos.

2.4.3 Fórmula/Produto

- Meio comercial: Caldo Selenito.

2.4.4 Procedimentos

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante.
- Aquecer até levantar fervura, homogeneizando de vez em quando.
- **Não autoclavar.**
- Aguardar esfriar e adicionar 0,04 g de novobiocina por litro de meio (novobiocina inibe o véu de *Proteus* spp.); pH: 7,0 +/- 0,2 (25°C).
- Esterilizar por filtração.
- Distribuir 7 mL em tubos estéreis de 15x150 mm com tampa de rosca.

2.4.5 Controle de qualidade

A) Crescimento:

- Preparar uma suspensão de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 na escala 0,5 de Mac Farland.
- Semear 0,01 mL da de cada suspensão nos tubos de Selenito com novobiocina. Incubar os tubos a 35 ±1°C por 24 horas e semear 0,01 mL na placa de SS.
- Incubar a placa a 35 ±1°C por 12 a 18 horas.
- Positivo: crescimento da *Salmonella typhimurium*.
- Negativo: crescimento parcial ou não há crescimento de *Escherichia coli*.

Consultar: BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 101 de 11/08/1193. Métodos analíticos para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes e métodos microbiológicos. Diário Oficial da União. (Anexo-6.1.3 Avaliação do desempenho de caldo seletivo com uma mistura de culturas desejadas e não desejadas).

2.4.6 Inoculação

- Inocular 3 a 4 alçadas da amostra de fezes no meio de cultura.
- Incubar a $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 12 a 18 horas.

2.4.7 Interpretação

- Cor original do meio: vermelho tijolo.

2.4.8 Conservação e validade

- Conservar embalado de 4 a 8°C por 3 meses.

2.5 Caldo tetrionato

2.5.1 Princípio

- Os sais de bile contidos no meio de tetrionato inibem micro-organismos Gram-positivos e a adição da solução de iodo e de verde brilhante 0,1% inibem a flora intestinal normal de espécies fecais.

2.5.2 Utilidade

- Meio de enriquecimento para *Salmonella* spp.

2.5.3 Fórmula/produto

- Meio comercial: Caldo Tetrionato.
- **Solução de iodo para tetrionato:** para ser adicionado no caldo antes de semeada a amostra de fezes.
 - Iodo metálico 6,0 g
 - Iodeto de potássio 5,0 g
 - Água destilada 20,0 mL

2.5.4 Procedimentos

A) Caldo tetrionato

- Pesar e hidratar o meio segundo instruções do fabricante.
- Aquecer até ferver.
- Distribuir 10 mL em tubos estéreis com tampa de rosca.
- Não autoclavar. Conservar de $4-8^{\circ}\text{C}$.

B) Solução de iodeto de potássio

- Macerar o iodeto de potássio e o iodo em um gal.
- Adicionar água aos poucos até dissolver completamente.
- Colocar em frasco âmbar.

2.5.5 Controle de qualidade

A) Crescimento:

- Preparar uma suspensão de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e uma cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 na escala 0,5 de Mac Farland.
- Semear 0,01 mL de cada suspensão nos tubos de caldo tetrionato. Incubar os tubos a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas e semear 0,01 mL na placa de SS. Se houver crescimento de Salmonella e inibição de Escherichia coli, liberar o lote para uso.

Consultar: BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº101 de 11/08/1193. Métodos analíticos para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes e métodos microbiológicos. Diário Oficial da União. (Anexo-6.1.3 Avaliação do desempenho de caldo seletivo com uma mistura de culturas desejadas e não desejadas).

2.5.6 Inoculação

- No momento da inoculação, adicionar 0,2 mL da solução de iodo no tubo e 0,1 mL da solução de verde brilhante 1% por tubo.
- Inocular 1 a 3 g da amostra de fezes e homogeneizar vigorosamente.
- Incubar a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 12 a 18 horas.

2.5.7 Interpretação

- Cor original do meio: límpido com precipitado branco.
- O crescimento é indicado pela turbidez do meio.
- Após incubação, semear 3 a 4 alçadas da amostra em uma placa de SS e/ou Mac Conkey.

2.5.8 Conservação e validade

- **Tetrionato:** Conservar de 4 a 8°C por até 3 meses.
- **Solução de iodo:** Conservar em frasco âmbar a temperatura ambiente por até 12 meses.

2.6 Meio de Tioglicolato com indicador

2.6.1 Princípio

- O meio de Tioglicolato dá suporte para o crescimento de vários micro-organismos. O potencial de oxidação e redução baixo do meio neutraliza efeitos antibacterianos das espécies preservadas com mercúrio.
- A resazurina e o azul de metileno são indicadores da posição de oxidação de aeróbios e a dextrose incluída na fórmula é para os micro-organismos que apresentam crescimento vigoroso na presença do carboidrato.

2.6.2 Utilidade

- Usado para o cultivo de micro-organismos aeróbios, microaerófilos e anaeróbios.
- Usado para controle de esterilidade bacteriana de diversos materiais.

2.6.3 Fórmula/produto

- Meio comercial: Meio de Tioglicolato caldo com indicador

2.6.4 Procedimentos

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante.
- Aquecer em bico de Bunsen, abrir fervura devido ao Ágar na sua composição (0,5g/L) até dissolver completamente.
- Distribuir 5 mL por tubo.
- Esterilizar em autoclave.
- pH: 7,2 +/- 0,2 (25°C)

2.6.5 Controle de qualidade

- Crescimento bom a excelente: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.

2.6.6 Conservação e validade

- Conservar embalado a temperatura ambiente por 3 meses.

2.6.7 Inoculação

- Com auxílio da alça bacteriológica, inocular o material biológico introduzindo a alça até a metade do tubo.
- Retirar a alça sem agitar o tubo.
- Incubar à 35 ± 1°C por 24 horas.

2.6.8 Interpretação

- Cor original: amarelo claro.
- Presença de crescimento: turvação do meio.

- Ausência de crescimento: meio permanece inalterado.
- Crescimento de micro-organismos anaeróbios: crescimento na profundidade do meio.
- Crescimento de micro-organismos aeróbios: crescimento na superfície do meio.

2.6.9 Recomendações

- Não usar o meio quando mais de 30% do tubo estiver com cor rosa ou esverdeado na superfície, pois indica a presença de oxigênio no meio.
- Recomenda-se o uso do meio recém-preparado, porém, se não houver a presença de oxigênio, pode-se usar um período maior.
- Não usar meios que estejam turvos.
- Não utilizar o meio quando o indicador atingir a metade do volume do meio.

2.7 Meio de Tioglicolato sem indicador

2.7.1 Princípio

- As substâncias redutoras tioglicolato, cisteína e sulfito de sódio produzem uma anaerobiose suficiente para micro-organismos anaeróbios exigentes.

2.7.2 Utilidade

- Usado para o cultivo de micro-organismos anaeróbios.

2.7.3 Fórmula/Produto

- Meio comercial: Meio de Tioglicolato caldo sem indicador.

2.7.4 Procedimentos

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante.
- Aquecer em bico de Bunsen, até dissolver completamente.
- Distribuir 5 mL por tubo.
- Esterilizar em autoclave.
- pH: 7,2 +/- 0,2 (25°C).

2.7.5 Controle de qualidade

- Crescimento bom a excelente: *Clostridium perfringens* ATCC 10543.

2.7.6 Conservação e validade

- Conservar embalado a temperatura ambiente por 3 meses.

2.7.7 Inoculação

- Com auxílio da alça bacteriológica, inocular o material biológico introduzindo a alça até o fundo do tubo.
- Retirar a alça sem agitar o tubo.
- Incubar à $35 \pm 1^\circ\text{C}$ em jarra com gerador de anaerobiose durante 48 horas.

2.7.8 Interpretação

- Cor original: amarelo claro.
- Presença de crescimento: turvação do meio.
- Ausência de crescimento: meio permanece inalterado.

2.7.9 Recomendações

- Não usar meios que estejam turvos.
- Se necessário, incubar um período superior à 48 horas.

2.8 Ágar MacConkey

2.8.1 Princípio

- O cristal violeta inibe o crescimento de micro-organismos Gram-positivos especialmente enterococos e estafilococos.
- A concentração de sais de bile é relativamente baixa em comparação com outros meios, por isso não é tão seletivo para Gram-negativos como, por exemplo, o Ágar SS.

2.8.2 Utilidade

- Isolar bacilos Gram-negativos (enterobactérias e não fermentadores) e verificar a fermentação ou não da lactose.

2.8.3 Fórmula/Produto

- Meio comercial: Ágar MacConkey.

2.8.4 Procedimentos

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante.
- Aquecer sob agitação até fundir o Ágar completamente.
- Esterilizar em autoclave.
- Resfriar até 50°C e distribuir 20 a 25 mL em placas de Petri 90 mm estéreis.
- Deixar em temperatura ambiente até resfriar.
- Embalar as placas com plástico PVC transparente e guardar em geladeira de 4 a 8°C .

2.8.5 Controle de qualidade

- Positivo: *Proteus mirabilis* ATCC 12453 (não fermentador de lactose).
- Positivo: *Escherichia coli* ATCC 25922 (fermentador de lactose).
- Negativo: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

2.8.6 Inoculação

- Inocular as placas e incubar por 18 a 24 horas.
- Se negativo após 24 horas, reincubar por mais 24 horas.

2.8.7 Interpretação

- Cor original do meio: rosa avermelhado.
- Crescimento de bacilos Gram-negativos.
- Colônias cor de rosa: fermentadoras de lactose.
- Colônias incolores: não fermentadoras de lactose.
- Não há crescimento de cocos Gram-positivos.

2.8.8 Conservação e validade

- Conservar as placas embaladas de 4 a 8°C por até 3 meses.

2.9 Ágar sangue

2.9.1 Princípio

- O meio de Ágar sangue, usando uma base rica como abaixo descrita, oferece ótimas condições de crescimento a maioria dos micro-organismos. A conservação dos eritrócitos íntegros favorecem a formação de halos de hemólise nítidos, úteis para a diferenciação de *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp.

2.9.2 Utilidade

- Usado para o isolamento de micro-organismos não fastidiosos.
- Verificação de hemólise dos *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp.
- Usado na prova de satelitismo (para identificação presuntiva de *Haemophilus* spp.).

2.9.3 Fórmula/Produto

- Meio comercial: Blood Ágar Base, Columbia Ágar Base, BHI Ágar, Mueller Hinton Ágar.
- Sangue desfibrinado de carneiro ou coelho: 5 mL para cada 100 mL de meio base.
- pH: 6,8 +/- 0,2 (25°C).

2.9.4 Procedimentos

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante.
- Esterilizar em autoclave.
- Esfriar a base à +/- 50°C.
- Adicionar 5 mL de sangue desfibrinado de carneiro para cada 100 mL de base.
- Homogeneizar delicadamente para não formar bolhas.
- Distribuir em placas de Petri de 90 mm de diâmetro.

2.9.5 Controle de qualidade

- Hemólise beta hemolítica: *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 ou *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- Hemólise alfa hemolítica: *Streptococcus do grupo viridans* ou *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305.
- Hemólise gama (sem hemólise): *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ou *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

2.9.6 Conservação e validade

- Conservar de 4 a 10°C por 20 a 30 dias.

2.9.7 Inoculação

- Estriar a superfície do meio, usando a técnica de semeadura para isolamento.
- No final da semeadura, picar o meio com a alça para verificar hemólise em profundidade.
- Incubar à 35°C 24 horas.

2.9.8 Interpretação

- Cor original do meio: vermelho.
- Beta hemólise: presença de halo transparente ao redor das colônias semeadas (lise total dos eritrócitos).
- Alfa hemólise: presença de halo esverdeado ao redor das colônias semeadas (lise parcial dos eritrócitos).
- Gama hemólise (sem hemólise): ausência de halo ao redor das colônias (eritrócitos permanecem íntegros).

2.9.9 Recomendações

- Não usar sangue de carneiro vencido, pois o meio fica hemolisado ou com cor muito escura, dificultando o estudo de hemólise.
- Não usar sangue humano, pois alguns micro-organismos não apresentam hemólise.
- Não adicionar o sangue na base do meio quente, pois as hemácias rompem-se, dificultando o estudo de hemólise.

Por ser um meio rico, o crescimento a partir de materiais biológicos em geral costuma ser abundante, sempre que necessário, isolar a colônia em estudo para os procedimentos de identificação, para não correr o risco de trabalhar com cepas misturadas.

2.10 Ágar Cled – Cystine Lactose Electrolyte Deficient

2.10.1 Princípio

- Usado para isolamento e quantificação de micro-organismos presentes em amostras de urina. A deficiência de eletrólitos inibe o véu de cepas de *Proteus*.

2.10.2 Utilidade

- Isolar e quantificar micro-organismos Gram-positivos, Gram-negativos e leveduras.

2.10.3 Fórmula/Produto

- Meio comercial: Ágar Cled.

2.10.4 Procedimentos

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante.
- Esterilizar em autoclave.
- Resfriar à +/- 50°C e distribuir de 20 a 25 mL em placas de Petri 90 mm estéreis.
- Deixar em temperatura ambiente até resfriar.
- pH: 7,3 +/- 0,2 (25°C)

2.10.5 Controle de qualidade

- Positivo:
 - Lactose positiva: *Escherichia coli* ATCC 25922: crescimento moderado a denso, colônias médias ou grandes amareladas, após 48 horas de incubação.
 - Lactose negativa: *Proteus vulgaris* ATCC 8427: crescimento moderado a denso, colônias azuis translúcidas.
- Negativo: ausência de crescimento.

2.10.6 Inoculação

- Verificar técnica de semeadura quantitativa.

2.10.7 Interpretação

- Cor original do meio: azul claro.
- Colônias lactose positiva: cor amarela.
- Colônias lactose negativa: cor azul.

A) Características de crescimento:

- *Escherichia coli*: colônias opacas, amarelas com ligeira cor amarelo escuro no centro, com cerca de 1,25 mm de diâmetro, as não fermentadoras de lactose colônias azuis.
- Espécies de *Klebsiella*: colônias muito mucosas, cor variável de amarelo a branco azulado.
- Espécies de *Proteus*: colônias azul translúcidas, geralmente menor que *E.coli*.
- Espécies de *Salmonella*: colônias planas, cor azul.
- *Enterococcus faecalis*: colônias amarelas, com cerca de 0,5 mm de diâmetro.
- *Staphylococcus aureus*: colônias amarelas, com cerca de 0,75 mm de diâmetro.
- *Staphylococcus coagulase negativa*: colônias amarelo palha e brancas.
- *Corynebacterium*: colônias pequenas e cinza.
- *Lactobacilos*: colônias pequenas e com superfície rugosa.
- *Pseudomonas aeruginosa*: colônias verdes, com superfície prateada e periferia rugosa.

2.10.8 Conservação e validade

- Conservar embalado e refrigerado (entre 4 a 8°C) por até 3 meses (tubos) e 1 mês (placas).

2.10.9 Recomendações

- Organismos que fermentam lactose baixam o pH e mudam a cor do meio de verde para amarelo, podendo assim verificar se o micro-organismo é lactose negativa ou positiva.
- Espécies de *Shigella* não crescem em meios deficientes em eletrólitos.

2.11 Caldo BHI – Brain Heart Infusion

2.11.1 Princípio

- É um meio derivado de nutrientes de cérebro e coração, peptona e dextrose.
- A peptona e a infusão são fontes de nitrogênio, carbono, enxofre e vitaminas.
- A dextrose é um carboidrato que os micro-organismos utilizam para fermentação.

2.11.2 Utilidade

- Meio para cultivo de estreptococos, pneumococos, meningococos, enterobactérias, não fermentadores, leveduras e fungos.
- Pode ser utilizado na preparação do inóculo para teste de susceptibilidade aos antimicrobianos,
- Para realização de teste de coagulase em tubo, para teste de crescimento bacteriano a 42 e 44°C, para teste de motilidade em lâmina.

2.11.3 Fórmula/Produto

- Meio comercial: Caldo BHI (infusão de cérebro e coração).

2.11.4 Procedimentos

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante.
- Distribuir 3,0 mL em tubos com tampa de rosca.
- Esterilizar em autoclave.
- Retirar os tubos da autoclave e deixar esfriar em temperatura ambiente.
- pH: 7,4 +/- 0,2 (25°C).

2.11.5 Controle de qualidade

- Positivo: *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305 e *Candida albicans* ATCC 10231.
- Negativo: meio sem inocular.

2.11.6 Inoculação

- Com o auxílio de uma alça ou fio bacteriológico, inocular a colônia ou o material a ser testado-realizar o teste com colônias puras de 18 a 24 horas.
- Incubar a 35°C ±2 por 24 a 48 horas.
- Para isolamento de fungos incubar por até 5 dias.

2.11.7 Interpretação

- Cor original do meio: amarelo claro, límpido.
- Positivo: presença de turvação = crescimento bacteriano.
- Negativo: ausência de turvação.

2.11.8 Conservação e validade

- Conservar de 4 a 10°C por 6 meses.

2.11.9 Recomendações

- Para cultivo de anaeróbios, acrescentar 0,1% de Ágar.
- Para crescimento de *Haemophilus* e outros fastidiosos é necessário adição de suplementos a base de L-cisteína, NAD (fator V) e hemina (fator X).

2.12 Löwenstein Jensen

2.12.1 Princípio

- A base do meio é constituída por ovos integrais, o que permite amplo crescimento das micobactérias e o crescimento é satisfatório para o teste de niacina (que é positivo para *Mycobacterium tuberculosis*).

2.12.2 Utilidade

- Isolamento primário das micobactérias.

2.12.3 Fórmula/Produto

- Meio comercial: Meio TB para Bacilos de Koch Seg. Löwenstein Jensen ou Löwenstein Medium Base.
- Ovos de galinha frescos.

A) 1ª Etapa:

- Meio base
 - Fosfato monopotássico 1,2 g
 - Sulfato de magnésio 0,12 g
 - Citrato de magnésio 0,3 g
 - L-asparagina 1,8 g
 - Fécula de batata 15,0 g
 - Glicerol 6,0 mL
 - Verde malaquita 0,2g
 - Água destilada estéril qsp 320mL

Vide orientações do fabricante

B) 2ª ETAPA:

- Ovos totais 500 mL

2.12.4 Procedimentos

A) Preparação dos ovos:

- Escovar os ovos, um a um, com escova de cerdas macias.
- Deixar os ovos submersos em água e detergente comum, durante 30 minutos.
- Enxaguar com água corrente cuidadosamente um a um.
- Deixar os ovos submersos em álcool etílico a 70% durante 30 minutos.
- Retirar os ovos cuidadosamente e secar com pano estéril.
- Reservar os ovos.

B) Meio comercial:

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante.
- Esterilizar em autoclave.
- Resfriar a base a 45 – 50°C.
- Quebrar os ovos, um a um, cuidadosamente em copo de béquer estéril e transferir, um a um, para uma proveta estéril de 500 mL.
- Completar a proveta com ovos até completar 500 mL.
- Transferir os ovos para um copo de liquidificador estéril – se não tiver liquidificador próprio para laboratório, transferir os ovos para um balão de 1000 mL contendo pérolas de vidro de tamanho médio, ambos estéreis.
- Homogeneizar os ovos.
- Passar os ovos para o balão que contém a base fria, filtrando em funil e gaze estéril.
- Homogeneizar bem.
- Distribuir 10 a 12 mL por tubo de rosca estéril.
- Colocar os tubos no coagulador inclinados com a superfície em forma de bico de flauta (ângulo de 45°) durante 50 minutos a 85°C – se não tiver coagulador, pode-se coagular os ovos em banho de areia à 85°C colocado em estufa de esterilização, também por 50 minutos, tendo o cuidado de verificar a temperatura constantemente.

2.12.5 Controle de qualidade

- Esterilização: colocar todos os tubos em estufa.
- Crescimento bom a excelente:
 - *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25618
 - *Mycobacterium avium* ATCC 25291

2.12.6 Conservação e validade

- Conservar entre 4 a 8°C por 3 meses.

2.12.7 Inoculação

- Para materiais biológicos de sítios contaminados, fazer descontaminação prévia pelas técnicas desejadas (Petroff, NALC, Lauryl sulfato de sódio, Corper & Stoner modificado).
- Semear 5 gotas ou mais, cobrindo bem a superfície do meio.
- Manter os tubos inclinados com a tampa semiaberta até secar bem o inóculo.
- Depois de seco o inóculo, rosquear os tubos e incubar 60 dias à 35°C.
- Semanalmente, abrir as tampas próximo ao bico de Bunsen para ventilar os cultivos e observar a presença ou não de crescimento.

2.12.8 Interpretação

- Cor original do meio: verde claro.
- Positivo: Crescimento de colônias amarelas.
- Negativo: ausência de crescimento.

2.12.9 Recomendações

- Como é um meio rico em proteínas, bactérias proteolíticas contaminam o meio, liquefazendo-o, para isto, deve-se fazer uma leitura com 24 horas de incubação para tirar as culturas que possam ter contaminado.
- Não usar ovos velhos.
- Não quebrar mais que um ovo por vez, pois pode ter algum estragado e contaminar os demais.
- Manter sempre mais que um béquer estéril para o caso de haver algum ovo estragado.
- Não liberar culturas negativas com tempo inferior a 60 dias de incubação, pois as micobactérias desenvolvem-se lentamente.
- Fazer um esfregaço do crescimento e corar pela técnica de Ziehl para confirmar ser um Bacilo Álcool Ácido Resistente, pois alguns contaminantes podem crescer com pigmento amarelo.

2.13 Meio bifásico: Löwenstein e Middlebrook

2.13.1 Princípio

- O meio é constituído de duas fases, uma sólida que é o meio de Löwenstein Jensen e uma líquida, que é o meio 7H-9, juntos fornecem os nutrientes necessários para o desenvolvimento das micobactérias isoladas de materiais nobres.

2.13.2 Utilidade

- Sistema desenvolvido para o isolamento de micobactérias do sangue e de materiais paucibacilares, como líquido pleural, biópsias, entre outros.

2.13.3 Fórmula/Produto

- Meio comercial: Meio TB para Bacilos de Koch Seg. Löwenstein Jensen ou Löwenstein Medium Base.
- Meio comercial: Middlebrook 7H-9 broth.
- Meio comercial: Middlebrook Enrichment (suplemento para enriquecimento).
- Ovos de galinha frescos.

2.13.4 Procedimentos

A) Fase sólida:

- Meio de Löwenstein Jensen: procedimento igual ao já descrito. Distribuir 12 mL do meio em frascos estéreis com capacidade para 100 mL com tampão de algodão e levar ao coagulador na posição inclinada a 85°C por 50 minutos.

B) Fase líquida:

- Meio Middlebrook 7H-9 broth:
 - . Pesar e hidratar conforme instruções do fabricante.
 - . Adicionar o glicerol, conforme instruções do fabricante.
 - . Esterilizar em autoclave.
 - . Resfriar a base à 50°C.
 - . Adicionar o suplemento Middlebrook Enrichment, conforme instruções do fabricante.
 - . Homogeneizar bem.

C) Fase sólida + líquida:

- Distribuir 15 mL do Meio Middlebrook 7H-9 em cada frasco de Löwenstein Jensen inclinado e coagulado.
- Fazer o controle de qualidade de esterilidade.
- Retirar o tampão de algodão e lacrar os frascos com tampa de borracha (previamente submersas em álcool etílico 70% durante 30 minutos) e lacre de alumínio. As tampas e os lacres podem ser autoclavados num recipiente e retirados com pinça estéril.
- pH: 6,6 +/- 0,2.

2.13.5 Controle de qualidade

- Crescimento bom a excelente:
 - *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 27294 e *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841.

2.13.6 Conservação e validade

- Conservar os frascos embalados de 4 a 8°C por até 3 meses.

2.13.7 Inoculação

- Por serem materiais estéreis, não é necessário a descontaminação.
- Colher assepticamente 5 mL de sangue e inocular no frasco.
- Se for outro material, inocular até 5 mL de material.
- Incubar durante 60 dias à 35 ± 1°C.
- Banhar o meio sólido semanalmente.

2.13.8 Interpretação

- Cor original do meio: parte sólida: verde clara, parte líquida: âmbar claro.
- Positivo: turvação do meio líquido e crescimento de colônias amarelas no meio sólido.
- Negativo: ausência de turvação e crescimento nos meios líquido e sólido.

2.13.9 Recomendações

- Não usar frascos com meio líquido turvo.
- Volumes de inóculos inferiores a 2,5 mL podem resultar em culturas falso – negativas.
- Não liberar culturas negativas com tempo inferior a 60 dias de incubação, pois as micobactérias desenvolvem-se lentamente.
- Fazer um esfregaço do crescimento e corar pela técnica de Ziehl para confirmar ser um Bacilo
- Álcool Ácido Resistente, pois alguns contaminantes podem crescer com pigmento amarelo.

2.14 Ágar Mycosel

2.14.1 Princípio

- A Cicloheximida, um dos componentes do meio, serve para selecionar dermatófitos. O cloranfenicol inibe o crescimento de bactérias e alguns fungos filamentosos.

2.14.2 Utilidade

- Isolamento de fungos patogênicos, principalmente dermatófitos, a partir de material de investigação contaminado.

2.14.3 Fórmula/Produto

- Meio comercial: Mycosel Ágar, Mycobiotic Ágar ou Ágar seletivo para fungos patogênicos.

2.14.4 Procedimentos

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante.
- Esterilizar em autoclave.
- Resfriar à +/- 50°C e distribuir em placas de 90 mm de diâmetro ou 4 mL por tubo ou 20mL por tubo de 20x200mm.
- Se distribuir em tubos, distribuir antes da esterilização e deixar solidificar com inclinação em forma de bico de flauta (ângulo de 45°). pH: 6,9 +/- 0,1.

2.14.5 Controle de qualidade

- Crescimento bom a excelente: *Trichophyton verrucosum* ATCC 36058, *Candida albicans* ATCC 10231.
- Crescimento inibido: *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Candida tropicalis*, *Penicillium* spp.

2.14.6 Conservação e validade

- Conservar embalado de 4 a 8°C por até 3 meses (tubos) e 1 mês (placas).

2.14.7 Inoculação

- Inocular sempre dois tubos ou placas.
- Se em placa: semear com a técnica de semeadura quantitativa.
- Se em tubo: estriar na superfície inclinada do meio.
- Incubar um dos meios semeados em temperatura ambiente (25°C) e o outro a 37°C.
- Observar diariamente a presença ou não de crescimento.
- Incubar 40 dias.

2.14.8 Interpretação

- Cor original do meio: amarelo claro opalescente.
- Após o crescimento, deve-se seguir a identificação do micro-organismo que cresceu.

2.14.9 Recomendações

- A ausência de crescimento não indica uma cultura negativa para fungos, pois alguns fungos podem ter o crescimento inibido nesse meio.
- Recomenda-se o uso de meios em tubos, pois a incubação demorada resseca com facilidade o meio contido em placas.

2.15 Ágar Sabouraud Dextrose

2.15.1 Princípio

- Meio com nutrientes que favorece o crescimento de diversos fungos leveduriformes e filamentosos.

2.15.2 Utilidade

- Cultivo e crescimento de espécies de *Candidas* e fungos filamentosos, particularmente associados a infecções superficiais.
- Caracterização macroscópica do fungo filamentoso (colônia gigante).

2.15.3 Fórmula/Produto

- Meio comercial: Sabouraud Dextrose Ágar.

2.15.4 Procedimentos

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante.
- Esterilizar em autoclave.
- Resfriar à +/- 50°C e distribuir em placas de 90 mm de diâmetro ou 4 mL por tubo ou 20mL por tubo de 20x200mm.
- Se distribuir em tubos, distribuir antes da esterilização e deixar solidificar com inclinação em forma de bico de flauta (ângulo de 45°). pH: 5,6 +/- 0,1.

2.15.5 Controle de qualidade

- Crescimento bom a excelente: *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus niger* ATCC 16404.

2.15.6 Conservação e validade

- Conservar embalado de 4 a 8°C por até 3 meses (tubos) e 1 mês (placas).

2.15.7 Inoculação

- Inocular sempre dois tubos ou placas.
- Se em placa: semear com a técnica de semeadura quantitativa.
- Se em tubo: semear na superfície inclinada do meio.
- Incubar um dos meios semeados em temperatura ambiente (25°C) e o outro à 37°C.
- Observar diariamente a presença ou não de crescimento.
- Incubar 40 dias.

2.15.8 Interpretação

- Cor original do meio: amarelo claro opalescente.
- Após o crescimento, deve-se seguir a identificação do micro-organismo que cresceu.

2.15.9 Recomendações

- Recomenda-se o uso de meios em tubos, pois a incubação demorada resseca com facilidade o meio contido em placas.
- Não usar meios vencidos e/ou ressecados.
- Para suspeitas de *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis*, semear em BHI Ágar.



Capítulo 3:

Meios Comerciais para Provas de Identificação

*Rosângela Aparecida Mendes Silva
Maria Carmen Gonçalves Lopes
Julia Taeko Utiyama Yoshida*

3.1 Base de nitrogênio para leveduras – Yeast Nitrogen Base

3.1.1 Princípio

- Determina a capacidade das leveduras de assimilar carboidratos, utilizando um meio a base de Nitrogênio, livre de carboidratos e discos de papel impregnados com carboidratos, nos quais observa presença de crescimento ao redor, após um período de incubação.

3.1.2 Utilidade

- Identificar as espécies de leveduras através da prova de assimilação de carboidratos.

3.1.3 Fórmula/Produto

- Meio comercial: Yeast Nitrogen Base ou Base de nitrogênio para leveduras.
- Discos comerciais de carboidratos.
- Discos preparados no laboratório, impregnados com soluções de carboidratos a 1%:
 - Carboidrato 1 g.
 - Água destilada 100 mL.

3.1.4 Procedimentos

A) Para os discos de carboidratos:

- Se for preparar os discos com carboidratos, preparar 2 dias antes de fazer o meio.
- Usar discos estéreis disponíveis para compra ou esterilizar papel de filtro de 10 mm de diâmetro em autoclave.

- Pesar o carboidrato (cada carboidrato em frasco separado) e adicionar água, homogeneizar bem até completa dissolução – carboidratos utilizados: glicose, maltose, sacarose, lactose, galactose, melibiose, celobiose, inositol, xilose, rafinose, trealose, dulcitol.
- Esterilizar por filtração (cada um em frasco separado).
- Impregnar os discos previamente estéreis (embeber totalmente os discos).
- Deixar os discos em estufa à 37°C até secarem totalmente.

B) Para meio base de nitrogênio:

- Pesar e hidratar conforme instrução do fabricante; acrescentar metade do volume de água; Esterilizar por filtração e reservar.
- Pesar Ágar bacteriológico (13g/l) e acrescentar a outra metade de água.
- Esterilizar em autoclave e resfriar.
- Misturar as duas partes e distribuir 20mL em tubos 20x150 com tampa estéreis.

3.1.5 Controle de qualidade

	POSITIVO	NEGATIVO
Glicose	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida krusei</i>
Maltose	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida krusei</i>
Sacarose	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida krusei</i>
Lactose	<i>Candida kefir</i>	<i>Candida krusei</i>
Galactose	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida krusei</i>
Melibiose	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Candida krusei</i>
Celobiose	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Candida krusei</i>
Inositol	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Candida krusei</i>
Xilose	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida krusei</i>
Rafinose	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Candida krusei</i>
Trealose	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida krusei</i>
Dulcitol	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Candida krusei</i>

3.1.6 Conservação e validade

- Conservar os tubos de 4 a 8°C por até 3 meses.
- Discos: refrigerado e se possível em dessecador durante 1 ano ou mais.

3.1.7 Inoculação

- Aquecer o tubo contendo 20 mL de meio base de nitrogênio até fundir totalmente.
- Resfriar a base à 47 – 48°C.

- Fazer uma suspensão das leveduras na escala 4 ou 5 de McFarland em 4 mL de água destilada estéril,, usando um cultivo de leveduras de 24 a 72 horas.
- Despejar a suspensão de leveduras no tubo contendo a base de nitrogênio.
- Homogeneizar bem.
- Despejar o conteúdo homogeneizado (meio base + suspensão de leveduras) em placa de Petri de estéril de 150 mm de diâmetro.
- Esperar solidificar em temperatura ambiente.
- Colocar os discos impregnados com carboidratos com auxílio de uma pinça flambada.
- Incubar à 30°C durante 18 a 24 horas.

3.1.8 Interpretação

- Cor original do meio: amarelo palha.
- Positivo: halo de crescimento ligeiramente opaco ao redor dos discos, que significa a assimilação do açúcar pela levedura.
- Negativo: Ausência de halo de crescimento. O meio permanece inalterado.

3.1.9 Recomendações

- Não usar cultivos de leveduras superiores a 72 horas.
- Não usar inóculo inferior ao recomendado, pois pode resultar em prova falso – negativa.
- Não adicionar a suspensão de leveduras à base com temperatura superior a 48°C, pois pode inativar as células e resultar em prova falso – negativa.
- Após homogeneizar o meio base e suspensão de leveduras, despejar imediatamente na placa de Petri, pois solidifica rapidamente.

3.2 Ágar Citrato Simmons

3.2.1 Princípio

- Verifica a capacidade da bactéria de utilizar o citrato de sódio como única fonte de carbono, juntamente com sais de amônia, alcalinizando o meio.

3.2.2 Utilidade

- Diferenciar gêneros e espécies de enterobactérias e não fermentadores.

3.2.3 Fórmula/Produto

- Meio comercial: Ágar Citrato Simmons.

3.2.4 Procedimentos

- Pesar e hidratar o meio segundo instruções do fabricante.
- Ajustar o pH para $6,9 \pm 0,2$.
- Aquecer sob agitação até fundir o Ágar.
- Distribuir em tubos com tampas de rosca.
- Esterilizar em autoclave.
- Retirar os tubos da autoclave e incliná-los ainda quentes, para que solidifiquem com a superfície em forma de bico de flauta (ângulo de 45°). Deixar solidificar em temperatura ambiente.

3.2.5 Controle de qualidade

- Positivo: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883.
- Negativo: *Escherichia coli* ATCC 25922.

3.2.6 Inoculação

- Com o auxílio de um fio bacteriológico, inocular na superfície a colônia, não furar a base.
- Realizar o teste com colônias puras de 18 a 24 horas.

3.2.7 Interpretação

- Cor original do meio: verde
- Positivo: cor azul ou crescimento no local do inóculo.
- Negativo: não há crescimento e a cor permanece inalterada.
- Se houver crescimento visual na área do inóculo sem mudança de cor, o teste pode ser considerado positivo, reincubar por 24 até 72 horas, a incubação poderá mudar a cor do meio para azul (alcalino).

A) Leitura inicial com 24 horas:

- Se resultado positivo: encerrar o teste.
- Se resultado negativo ou houver dúvida: reincubar por mais 24/48 horas.

B) Leitura com 48 horas:

- Se houver crescimento visível na área do inóculo sem mudança de cor, o teste pode ser considerado positivo, (encerrar o teste).
- Se resultado negativo ou houver dúvida, reincubar por 24 até 72 horas, a incubação poderá mudar a cor do meio para alcalino (azul).

3.2.8 Conservação e validade

- Conservar de 4 a 10°C de 6 a 8 semanas.
- Após esse período realizar controles negativo e positivo semanalmente.

3.2.9 Recomendações

- Manter a tampa do tubo frouxa, o meio necessita de oxigênio.
- Não se devem transportar colônias de meios que contenham glicose ou outros nutrientes/substratos, pois podem entrar em contato com o meio de citrato, podendo dar um resultado falso positivo.
- Se algum resultado estiver duvidoso, inocular um novo tubo e incubar em temperatura ambiente (22 a 25°C) por até 7 dias.
- Não usar repiques de caldo.
- Deixar o tubo em temperatura ambiente antes de inocular a bactéria.
- Para fazer o inóculo flambar o fio bacteriológico.
- Não fazer inóculo muito denso (pode acidificar o meio deixando-o amarelo).

3.3 Ágar Bile-Esculina

3.3.1 Princípio

- A prova de Bile-Esculina é baseada na capacidade de algumas bactérias hidrolisarem esculina em presença de bílis. A esculina é um derivado glicosídico da cumarina. As duas moléculas do composto (glicose e 7-hidroxycumarina) estão unidas por uma ligação éster através do oxigênio.
- A esculina é incorporada em um meio contendo 4% de sais biliares.
- As bactérias Bile-Esculina POSITIVAS, são capazes de crescer em presença de sais biliares. A hidrólise da esculina no meio resulta na formação de glicose e esculetina. A esculetina reage com íons férricos (fornecidos pelo composto inorgânico do meio – o citrato férrico), formando um complexo negro.

3.3.2 Utilidade

- Separação dos *Streptococcus* Bile-Esculina positiva dos Bile-Esculina negativa.
- Identificação dos *Enterococcus* spp., que são Bile-Esculina positiva.
- Identificação de bacilos Gram-negativos não fermentadores e enterobactérias, usar o meio sem bílis (vide prova de esculina).

3.3.3 Fórmula/Produto

- Meio comercial: Ágar Bile-Esculina
- Fórmula: Peptona 5 g
- Extrato de carne 3 g
- Bílis 40 g
- Esculina 1 g
- Citrato férrico 0,5 g
- Ágar 15 g

- Água destilada 1000 mL
- pH = 6,8 +/- 0,2 (25°C)

3.3.4 Procedimentos

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante.
- Fundir o meio.
- Distribuir 2,5 mL por tubo.
- Esterilizar em autoclave.
- Após retirar da autoclave, inclinar os tubos ainda quentes para que solidifiquem com a superfície em forma de “bico de flauta” (ângulo de 45°).

3.3.5 Controle de qualidade

- Positivo: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.
- Negativo: *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.

3.3.6 Conservação e validade

- Conservar de 4 a 10°C por 3 meses.

3.3.7 Inoculação

- Estriar a superfície inclinada do meio.
- Incubar a 35°C 24 horas.

3.3.8 Interpretação

- Cor original do meio: acinzentado.
- Positivo: Enegrecimento em pelo menos metade ou mais do meio.
- Negativo: Ausência de enegrecimento ou crescimento de menos da metade do meio após 72 horas de incubação.

3.3.9 Recomendações

- Provas negativas com 24 horas de incubação, recomenda-se período de incubação maior (48 horas).
- Alguns *Streptococcus do grupo viridans* (cerca de 3%) podem hidrolisar a esculina em presença de bÍlis se incubados em atmosfera de CO₂.

3.4 Ágar Sangue – CAMP

3.4.1 Princípio

- Consiste na interação da beta hemólise secretada pelo *Staphylococcus aureus* com o micro-organismo em estudo, que secreta uma proteína, denominada “fator CAMP”, produzindo aumento de hemólise no local da inoculação.

3.4.2 Utilidade

- Separação do *Streptococcus* beta hemolítico presumível do grupo B de Lancefield (*S. agalactiae*) e da *Listeria monocytogenes* (CAMP positivos) dos demais *Streptococcus* beta hemolíticos e espécies de *Listeria*.

3.4.3 Fórmula/Produto

- Para essa prova utiliza-se:
 - Placa de meio Ágar Sangue.
 - Cepa de *Staphylococcus aureus* produtora de beta hemolisina ATCC 25923.

3.4.4 Controle de qualidade

- Positivo: *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813.
- Negativo: *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.

3.4.5 Inoculação

- Com auxílio do fio bacteriológico, semear na superfície de meio Ágar Sangue a cepa de *Staphylococcus aureus* com uma única linha reta.
- Novamente com o fio bacteriológico (flambado), tocar nas colônias em estudo.
- Semear uma única linha reta na superfície do meio Ágar Sangue, perpendicularmente à linha de semeadura do *S. aureus*, sem tocar no inóculo do *S. aureus*.
- Logo em seguida, sem flambar o fio, picar o meio Ágar Sangue duas vezes, uma de cada lado da semeadura da cepa em estudo, sem tocar nas duas linhas de inóculo já feitos (a do *S. aureus* e da cepa em estudo).
- Incubar à 35°C 24 horas.
 - (a) Inóculo do *S. aureus*.
 - (b) Inóculo da cepa em estudo.

3.4.6 Interpretação

- Positivo: Aumento da área de hemólise em forma de flecha no local onde estão mais próximas as duas estrias de crescimento.
- Negativo: Ausência de aumento da hemólise. Observa-se nitidamente a hemólise do *S. aureus* e da cepa em estudo, inalteradas.

3.4.7 Recomendação

- Não utilizar cepas velhas de *S. aureus*, pois podem não produzir beta hemolisina.
- Não tocar as estrias da semeadura das cepas, para não dar um resultado falso – negativo.

- Não utilizar placas de Ágar Sangue velhas que dificultem a leitura da prova, já que é baseada na hemólise das cepas.

3.5 Caldo Base de Moeller

3.5.1 Princípio

- As descarboxilases são um grupo de enzimas com substrato específico, capazes de reagir com o grupo carboxila dos aminoácidos para formarem aminas alcalinas. Essa reação, conhecida como descarboxilação, origina dióxido de carbono como produto secundário.
- Emprega-se normalmente três aminoácidos para identificação dos micro-organismos: lisina, ornitina e arginina. A base de Moeller é a mais utilizada. Os produtos aminados específicos, são:
 - Lisina: Cadaverina.
 - Ornitina: Putrescina.
 - Arginina: Citrulina.

A conversão da arginina em citrulina é uma atividade de diidrolase, e não descarboxilase, na qual o grupo NH₂ é retirado da arginina como primeira etapa. Em seguida, a citrulina é convertida em ornitina, que sofre descarboxilação para formar putrescina.

- A incubação deve ser em anaerobiose e para isso é adicionado 1 mL de óleo mineral estéril após a inoculação. No início da incubação, a glicose contida no meio é fermentada e ocorre viragem de cor púrpura para o amarelo. Quando o aminoácido é descarboxilado, as aminas alcalinas formadas reverterem a cor do meio para púrpura original.

3.5.2 Utilidade

- Verificar a capacidade de micro-organismos usarem enzimas, auxiliando na identificação.
- Utilizado principalmente para identificações de enterobactérias, bacilos Gram-negativos não fermentadores, estafilococos.

3.5.3 Fórmula/Produto

- Meio base comercial: Caldo Base de Moeller para Descarboxilase.
- Aminoácidos: L lisina ou DL lisina, L ornitina ou DL ornitina, L arginina ou DL arginina.

3.5.4 Procedimentos

- Preparar os meios com a Base de Moeller e aminoácidos.
- Preparar o meio apenas com a Base de Moeller, sem aminoácidos, que será usada como controle.

- Seguir as recomendações do fabricante para pesar o meio Base de Moeller.
- Se usar aminoácido L (*levógiro*), adicionar 1 grama do aminoácido para cada 100 mL de meio base.
- Se usar aminoácido DL (*dextrógiro*), adicionar 2 gramas do aminoácido para cada 100 mL de meio base.
- Homogeneizar bem o meio.
- Acertar o pH para 6,0 com HCl 1 N.
- Distribuir 2 mL por tubo (usar tubos de rosca).
- Esterilizar em autoclave.

3.5.5 Controle de qualidade

- Positivo:
 - Lisina: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 ou *Enterobacter aerogenes* ATCC 13047.
 - Ornitina: *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 ou *Serratia marcescens* ATCC 13880.
 - Arginina: *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 ou *Enterobacter sakazakii*.
 - Negativo:
 - Lisina: *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 ou *Citrobacter freundii* ATCC 8454.
 - Ornitina: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 ou *Citrobacter freundii* ATCC 8454.
 - Arginina: *Enterobacter aerogenes* ATCC 13047 ou *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883.

3.5.6 Conservação e validade

- Conservar entre 4 a 10 °C por 3 meses.

3.5.7 Inoculação

- A partir de crescimento recente, inocular a colônia em estudo no tubo contendo o aminoácido e no tubo controle.
- Colocar aproximadamente 1 mL de óleo mineral estéril em cada tubo.
- Incubar à 35 +/- 1°C em aerobiose.

3.5.8 Interpretação

- Cor original do meio: púrpura.
- Positivo:
 - Tubo controle (sem aminoácido): amarelo e turvo – indica que o micro-organismo é viável e o pH do meio abaixou o suficiente para ativar as enzimas descarboxilase.
 - Tubo com aminoácido: púrpura e turvo – indica a formação de aminas a partir da reação de descarboxilação.

- Negativo:
 - Tubos controle e com aminoácido: púrpura.

3.5.9 Recomendações

- Verificar se o inóculo foi satisfatório para o crescimento, pois a cor original do meio – púrpura, sem apresentar turvação, não significa positividade e sim, ausência de crescimento bacteriano.
- Como a reação ocorre em anaerobiose, é imprescindível a adição de óleo mineral.
- Pode-se autoclavar o meio já com o óleo mineral ou adicionar após a inoculação do micro-organismo.
- Para alguns micro-organismos, como bacilos Gram-negativos não fermentadores, é necessário um período de incubação prolongado (24 a 72 horas).

3.6 Ágar Dnase

3.6.1 Princípio

- Cepas de alguns micro-organismos produzem DNase e endonuclease termoestável. Essas enzimas hidrolisam ácido desoxirribonucléico (DNA) contido no meio de cultura após um período de incubação. Posteriormente esse meio é acidificado com HCl 1N para a revelação da prova.

3.6.2 Utilidade

- Prova de identificação que separa os principais micro-organismos de importância clínica, entre eles:
 - DNase positivos: *Staphylococcus aureus*, *Serratia* spp. e *Proteus* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Cryseobacterium meningosepticum*, *Moraxella catarrhalis*.
 - DNase negativos: *Staphylococcus* coagulase negativa, demais enterobactérias, demais bacilos Gram-negativos não fermentadores.

3.6.3 Fórmula/Produto

- Meio comercial: DNase Ágar.

3.6.4 Procedimentos

Pode-se revelar a prova de duas maneiras:

- Com uma solução de ácido clorídrico 1 N
- Adicionando à base do meio de cultura azul de Toluidina O.
- Para a revelação com ácido clorídrico 1N:
 - Preparar e esterilizar o meio conforme instruções do fabricante.

- Esfriar o meio a aproximadamente 50°C.
- Distribuir em placas de petri de 50 mm de diâmetro.
- Preparar uma solução de HCl 1N, seguindo a fórmula abaixo:
 - $N = \frac{C1}{V}$ (Número de equivalentes grama de soluto)
(volume da solução)

$$C1 = \frac{M1}{E} \quad \begin{array}{l} \text{(Peso molecular do soluto)} \\ \text{(Volume da solução)} \end{array}$$

$$E = \frac{M}{x}$$

x: para bases: OH desprendido na reação
para ácidos: H⁺ ionizáveis
para oxidantes/redutores: variação do NOX
para sais normais: valência do cátion ou ânion

- Para a revelação com azul de Toluidina O:
 - Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante.
 - Acrescentar para cada 1000 mL de base 0,1g de azul de Toluidina O.
 - Esterilizar em autoclave.
 - Esfriar o meio a aproximadamente 50°C.
 - Distribuir em placas de petri de 50 mm de diâmetro.

3.6.5 Controle de qualidade

- Positivo: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ou *Serratia marcescens* ATCC 13880.
- Negativo: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 ou *Escherichia coli* ATCC 25922.

3.6.6 Conservação e validade

- Meio: 4 a 10 °C por 1 meses.
- Ácido Clorídrico 1N:
 - Guardar em frasco âmbar, em temperatura ambiente, ao abrigo de luz, calor e umidade.
 - Validade: 6 meses.

3.6.7 Inoculação

Para as duas técnicas de preparação, a inoculação é a mesma:

- Com auxílio de um fio bacteriológico, tocar nas colônias em estudo e fazer um esfregaço circular e denso na placa de DNase.
- Incubar à 35 +/- 1°C 24 horas.

3.6.8 Interpretação

A) Revelação com HCl 1 N:

- Cor original do meio: amarelo claro.
- Colocar sobre o crescimento bacteriano HCl 1 N até banhar totalmente a superfície do meio.
- Aguardar aproximadamente 3 minutos ou até que o meio fique opaco.
- Positivo: Presença nítida de halo claro na parte inferior e em volta da colônia.
- Negativo: Ausência de halo claro em volta da colônia.

B) Revelação com azul de toluidina O:

- Cor original do meio: azul claro
- Positivo: Presença de coloração rosa na parte inferior e em volta da colônia.
- Negativo: Ausência de cor rosa. O meio permanece com a cor original, azul.

3.6.9 Recomendações

- Usar sempre uma cepa controle positivo para facilitar a leitura da prova.
- Em uma mesma placa, pode-se fazer até 4 testes (placas de 50 mm de diâmetro).
- armazenamento incorreto e uso com validade vencida do HCl 1 N pode dar leituras falso negativas.
- Para a detecção da atividade de DNase não é necessário que haja crescimento, por isso é que semeadura deve ser de forma circular densa e não de estria.
- Para o meio preparado com Azul de Toluidina O, algumas cepas requerem um período maior de incubação (até 48 horas) para produzirem DNase.
- Usar cultura jovem (até 24 horas).

3.7 Ágar Esculina

3.7.1 Princípio

- Verifica se a bactéria é capaz de hidrolisar a esculina.
- A esculetina exige sais de ferro formando precipitado marrom escuro ou preto.

3.7.2 Utilidade

- Diferenciar gêneros e espécies de enterobactérias e não fermentadores.

- Para identificação de *Streptococcus* e *Enterococcus*, usar o meio com bÍlis, vide prova de Bile-Esculina.

3.7.3 Fórmula/Produto

- Ágar tríptic de soja (TSA) ou base de Ágar sangue 4 g.
- Citrato férrico 0,05 g.
- Esculina 0,1 g.
- Água destilada 100 mL.

3.7.4 Procedimentos

- Pesar o TSA ou a base de Ágar sangue, o citrato férrico e a esculina e colocar tudo no mesmo Erlenmeyer.
- Colocar água destilada.
- Ajustar o pH para 7,0.
- Aquecer lentamente até fundir o Ágar e dissolver o citrato férrico (lentamente porque o citrato férrico demora a dissolver).
- Distribuir 3 mL do meio em tubos com tampa de rosca.
- Esterilizar em autoclave.
- Retirar os tubos da autoclave e incliná-los ainda quentes para que solidifiquem com a superfície em forma de bico de flauta (ângulo de 45°). Deixar solidificar em temperatura ambiente.

3.7.5 Controle de qualidade

- Positivo: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883.
- Negativo: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

3.7.6 Inoculação

- Inocular colônias de crescimento recente (18 – 24 h).
- Picar o meio e semear na superfície do Ágar.
- Incubar a 35 °C por 24 horas.

3.7.7 Interpretação

- Cor original do meio: palha.
- Positivo: marrom escuro ou preto.
- Negativo: inalterado (palha).

3.7.8 Conservação e validade

- Conservar de 4 a 8°C, de 6 a 8 semanas.
- Após esse período realizar controle negativo e positivo semanalmente.

3.7.9 Recomendações

- A enzima glicosidase é responsável pela hidrólise da esculina em todas as enterobactérias exceto a *Escherichia coli*. A *Escherichia coli* não possui a enzima glicosidase sendo necessário usar a lactose, outro dissacarídeo ou outra fonte de carbono. Fazer um inóculo leve com agulha bacteriológica e interpretar após 18-24 horas.
- A produção de piocina pela *Pseudomonas aeruginosa* pode escurecer o meio, isso não é uma reação positiva.
- Resultado falso positivo pode ocorrer pela produção de H₂S em não fermentadores, semelhante ao bacilo da bactéria *Shewanella putrefaciens*.

3.8 Ágar Fenilalanina

3.8.1 Princípio

- Verifica a capacidade da bactéria de produzir ácido fenilpirúvico a partir da fenilalanina por ação enzimática.

3.8.2 Utilidade

- Diferenciar gêneros e espécies de enterobactérias.

3.8.3 Fórmula/Produto

- Meio comercial: Ágar Fenilalanina:
 - Solução de cloreto férrico.
 - Cloreto férrico 10 g.
 - Adicionar 100 mL de água destilada.
 - Colocar em frasco âmbar.
 - Validade: 6 meses.
 - A solução de cloreto férrico 10% é utilizada para revelar a atividade da enzima fenilalanina desaminase no meio de fenilalanina.

3.8.4 Procedimentos

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante.
- Aquecer sob constante agitação até fundir o meio.
- Ajustar o pH para 7,3 ±0,2.
- Distribuir em tubos com tampas de rosca.
- Esterilizar em autoclave.
- Retirar os tubos da autoclave e incliná-los ainda quentes para que solidifiquem com a superfície em forma de bico de flauta (ângulo 45°). Deixar solidificar em temperatura ambiente.

3.8.5 Controle de qualidade

- Positivo: *Proteus vulgaris* ATCC 8427 ou *Proteus mirabilis* ATCC 12453.

- Negativo: *Escherichia coli* ATCC 25922.

3.8.6 Inoculação

- Fazer um inóculo denso.
- Inocular colônia pura de 18 a 24 horas.
- Incubar a 35°C por 18 a 24 horas.

3.8.7 Interpretação

Adicionar diretamente o cloreto férrico no tubo inoculado, antes da interpretação do resultado e distribuir o reagente sobre a superfície do meio.

- Cor original do meio: amarelo palha.
- Positivo: formação de uma coloração esverdeada na superfície do meio após a adição do cloreto férrico.
- Negativo: o meio permanece inalterado.

3.8.8 Conservação e validade

- Conservar de 4 a 8°C, de seis a oito semanas.

3.8.9 Recomendações

- Um resultado positivo deve ser interpretado imediatamente após a adição do reagente, pois a cor verde desbota rapidamente. A interpretação deve ser feita em até 5 minutos.

3.9 CTA – Cystine Trypticase Ágar

3.9.1 Princípio

- CTA é um meio semi-sólido, recomendado para o estudo de fermentação de carboidratos de micro-organismos exigentes.

3.9.2 Utilidade

- Usado para diferenciar espécies de *Haemophilus* spp., *Neisseria* spp., *Branhamella catarrhalis* e *Corynebacterium* spp.

3.9.3 Fórmula/Produto

- Meio comercial Cystine Trypticase Ágar Medium.
- Carboidratos mais utilizados: glicose, maltose, lactose, sacarose, frutose, manose.
 - Carboidrato 10 g
 - Água destilada 100 mL
 - pH: 7,3 +/- 0,2

3.9.4 Procedimentos

- Esterilizar os carboidratos, separadamente, por filtração e reservar.
- Pesquisar o CTA conforme instruções do fabricante, acrescentar 900 mL de água e homogeneizar bem.
- Esterilizar em autoclave.
- Esfriar a base a aproximadamente 50°C.
- Adicionar o 100mL de solução de carboidrato a 1% esterilizado por filtração.
- Distribuir em 3 mL por tubo.
- Deixar os tubos esfriar na posição vertical.

3.9.5 Controle de qualidade

	POSITIVO	NEGATIVO
Glicose	<i>Neisseria sicca</i>	<i>Branhamella catarrhalis</i>
Maltose	<i>Neisseria sicca</i>	<i>Branhamella catarrhalis</i>
Lactose	<i>Neisseria lactamica</i>	<i>Neisseria sicca</i>
Sacarose	<i>Neisseria sicca</i>	<i>Branhamella catarrhalis</i>
Frutose	<i>Neisseria sicca</i>	<i>Branhamella catarrhalis</i>
Manose	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>

3.9.6 Conservação e validade

- Temperatura ambiente por 3 meses.

3.9.7 Inoculação

- Fazer um inóculo bem denso, no centro do meio.
- Incubar à 35°C em jarra com vela acesa e gaze embebida em água de torneira para manter a umidade da atmosfera.

3.9.8 Interpretação

- Cor original do meio: alaranjado.
- Positivo: cor amarela, indicando acidificação (fermentação) do meio e turvação.
- Negativo: Ausência de crescimento. O meio permanece com a cor original, alaranjado, e sem turvação.

3.9.9 Recomendações

- Para provas negativas, incubar um período maior (72 horas).
- Não autoclavar a base com o carboidrato, pois a alta temperatura pode degradar o carboidrato.
- Fazer inóculo denso, pois inóculos fracos podem dar resultado falso negativo.

3.10 Caldo Triptona e SIM

3.10.1 Princípio

- Determinam a habilidade do micro-organismo de metabolizar o triptofano em indol. Triptofano é um aminoácido que pode ser oxidado por certas bactérias resultando na produção de indol, após a adição de reagentes de Erlich ou Kovacs.

3.10.2 Utilidade

- Diferenciar gêneros e espécies de enterobactérias, não fermentadores, *Haemophilus* e anaeróbios.

3.10.3 Fórmula/Produto

- Meio comercial: Caldo Triptona.
- Meio comercial: SIM (sulfato/indol/motilidade Ágar).

Reativo Erlich

- Paradimetilaminobenzaldeído 1 g
- Álcool etílico (95%) 95 mL
- Ácido clorídrico concentrado 20 mL
 - Guardar em frasco âmbar em temperatura ambiente (22-25°C).
 - Cor original do reativo de Erlich: amarelo

Ou

- Reativo de Kovacs (pode ser adquirido comercialmente pronto para uso) ou ser preparado no laboratório:
- Álcool isoamílico 150 mL
- Paradimetilaminobenzaldeído 10,0 g
- Ácido clorídrico concentrado 50 mL
 - Dissolver o aldeído em álcool e adicionar lentamente o ácido clorídrico.
 - Guardar em frasco âmbar e no refrigerador quando não estiver em uso.

Obs.: Não conservar em temperatura ambiente por longo período, a cor pode ser alterada de amarelo palha para marrom, perdendo assim a sensibilidade.

Xilol: pode ser adquirido comercialmente pronto para uso.

3.10.4 Procedimentos

A) Meio Caldo Triptona

- Pesar e hidratar conforme instruções do fabricante.
- Aquecer sob agitação, até fundir o meio.
- Distribuir aproximadamente 3,0 mL em tubos com tampas de rosca.
- Esterilizar em autoclave.
- Retirar os tubos da autoclave.
- Deixar esfriar em temperatura ambiente na posição vertical.

B) Meio SIM

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante.
- Aquecer sob agitação, até fundir o meio.
- Distribuir aproximadamente 3,0 mL em tubos com tampas de rosca.
- Esterilizar em autoclave.
- Retirar os tubos da autoclave.
- Deixar solidificar em temperatura ambiente na posição vertical.

3.10.5 Controle de qualidade

Microrganismo	H ₂ S	INDOL	MOTILIDADE
<i>Proteus vulgaris</i>	POS	POS	POS
<i>Shigella sonnei</i>	NEG	NEG	NEG
<i>Escherichia coli</i>	NEG	POS	POS

3.10.6 Controle qualidade para meio Caldo Triptona:

- Positivo: *Escherichia coli* ATCC 25922.
- Negativo: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

3.10.7 Controle qualidade para meio SIM:

- *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Shigella sonnei* ATCC 25931, *Escherichia coli* ATCC 25922

3.10.8 Inoculação

A) Meio Caldo Triptona

- Fazer um inóculo leve com colônia pura de cultura de 18-24 horas (para enterobactérias, bacilos Gram-negativos não fermentadores ou anaeróbios).
- Fazer um inóculo denso com colônia pura de cultura de 18-24 horas (para *Haemophilus*).
- Incubar a 35°C por 24 horas (enterobactérias) ou até 48 horas (bacilos Gram-negativos não fermentadores ou anaeróbios) em aerobiose ou anaerobiose, respectivamente.

B) Meio SIM

- Com o auxílio da agulha, inocular uma colônia no meio na posição vertical, lentamente até a base.
- Afastar a agulha seguindo a linha inicial do inóculo.
- Incubar a 35°C por 18-24 horas.

3.10.9 Interpretação

- Cor original do meio.
- Após incubação, revelar com reagente de Ehrlich ou Kovacs.
- A escolha entre os reagentes de Ehrlich ou Kovacs depende da preferência dos Gram-negativos não fermentadores ou anaeróbios, que podem produzir mínima quantidade de indol.
 - Revelação com reativo de Ehrlich ou Kovacs no meio de Caldo Triptona
- Colocar 1 mL de xilol no tubo com crescimento bacteriano, homogeneizar vigorosamente e aguardar 1 minuto.
- Adicionar pela parede do tubo 0,5 mL do reativo de Erlich e realizar a leitura.
 - Indol positivo: aparecerá um anel vermelho logo abaixo da camada de xilol.
 - Indol negativo: permanecerá um anel amarelo logo abaixo da camada de xilol.
 - Revelação com reativo de Kovacs no meio SIM.
- Realizar a leitura da motilidade e do H₂S.
- Em seguida adicionar 5 gotas do reativo de Kovacs pela parede do tubo no meio contendo o crescimento bacteriano.
- Agitar o tubo suavemente e proceder a leitura do indol.
 - Motilidade positiva: micro-organismos móveis migram pela linha do inóculo e difundem-se no meio causando turbidez.
 - Motilidade negativa: bactéria tem um crescimento acentuado ao longo da linha do inóculo, em volta continua límpido.
 - H₂S positivo: ao longo da linha de inoculação aparecerá a cor negra.
 - H₂S negativo: linha ao longo da inoculação inalterada.
 - Indol positivo aparecerá um anel vermelho.
 - Indol for negativo aparecerá um anel amarelo.

3.10.10 Conservação e validade

- Caldo Triptona: 6 meses se conservado de 2 a 8°C.
- Meio SIM: 6 meses se conservado de 2 a 8°C em tubos com tampas de rosca, tubos com tampão de algodão o meio pode ressecar antes deste prazo.

3.10.11 Recomendações

- Um ótimo pH para triptofanase é levemente alcalino (pH 7,4-7,8), um pH ácido pode baixar a produção do indol indicando um resultado falso negativo ou positivo fraco.
- Cultura para ser testada produção de indol deve ser incubada em aerobiose, a baixa tensão de oxigênio baixa a produção de indol.
- Indol positivo se perde após 96 horas de incubação.

- Alguns micro-organismos formam indol, mas se quebram ou baixam rapidamente a produção, podendo ocorrer um resultado falso negativo. Ocorre principalmente entre algumas espécies de *Clostridium* spp.
- Pequenas modificações podem ser necessárias para testar a produção de indol em não fermentadores (fracos produtores de indol), como a utilização de um meio enriquecido, como o meio BHI enriquecido com 2% de soro de coelho ou isovitalax, extração com xilol e revelação com reagente de Ehrlich.
- Na extração de indol com o reagente xilol, colocar pequena quantidade de xilol para evitar a diluição do indol tornando-o fraco positivo ou negativo.
- Algumas cepas de *Cardiobacterium hominis*, *Kingella* spp., *Sutonella indologenes*, *Eikenella corrodens*, necessitam de inóculo denso no caldo de triptona, incubação de 48 horas, extração com xilol e revelação com reagente de Ehrlich.

3.11 Caldo Malonato

3.11.1 Princípio

- Determina a habilidade do micro-organismo de utilizar malonato de sódio como única fonte de carbono, resultando em alcalinização do meio.

3.11.2 Utilidade

- Diferenciar gêneros e espécies de enterobactérias e não fermentadores.

3.11.3 Fórmula/Produto

- Meio comercial: Caldo Malonato.

3.11.4 Procedimentos

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante.
- Ajustar o pH $6,7 \pm 0,2$.
- Distribuir 1,5 mL em tubos com tampa de rosca.
- Esterilizar em autoclave.
- Retirar os tubos da autoclave e deixar esfriar em temperatura ambiente.

3.11.5 Controle de qualidade

- Positivo: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883.
- Negativo: *Escherichia coli* ATCC 25922.

3.11.6 Inoculação

- Inocular colônias puras de 18 a 24 horas.
- Inóculo leve.

- Incubar a 35°C de 24-48 horas, observando o cultivo diariamente.

3.11.7 Interpretação

- Cor original do meio: verde.
- Positivo: azul.
- Negativo: inalterado (verde).

3.11.8 Conservação e validade

- Conservar de 4 a 10°C de 6 a 8 semanas.
- Após esse período realizar controle positivo e negativo semanalmente.

3.11.9 Recomendações

- Alguns resultados negativos produzem cor amarela, isso porque a fermentação da glicose aumenta a acidez.
- Alguns micro-organismos malonato positivo produzem uma fraca alcalinização, dificultando a interpretação. Se o resultado for duvidoso incubar um tubo sem inóculo para comparação, junto com o teste em questão, se não aparecer nenhum traço azul, incubar por mais 24 horas, liberando o resultado negativo após incubação de 48 horas.
- Cuidado ao interpretar resultados após incubação prolongada. Cor azul fraco (azul esverdeado) pode parecer uma reação fraca positivo podendo ser ignorado.

3.12 Caldo Nitrato

3.12.1 Princípio

- Determina a habilidade do micro-organismo de reduzir o nitrato (NO_3) a nitrito (NO_2) ou gás nitrogênio (N_2) (denitrificação).

3.12.2 Utilidade

- Diferenciar gêneros e espécies de enterobactérias, não fermentadores, anaeróbios, *Haemophilus*, *Neisseria* e *Mycobacterium*.

3.12.3 Fórmula/Produto

- Meio comercial: Caldo Nitrato.
- Reagentes para revelação da reação.

A) Solução A

- Ácido sulfanílico 0,8 g
- Ácido acético 5N 100 mL

B) Solução B

- N,N-dimetil-l-naftilamina 0,6 g
- Ácido acético 5N* 100 mL
- * Ácido acético 5N:
- Ácido acético glacial 40 mL
- Água destilada 100 mL
- Zinco em pó (pronto para uso)

3.12.4 Procedimentos

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante.
- Acertar o pH 7,0.
- Distribuir 3 mL do meio em cada tubo, contendo um tubo de Durhan invertido.
- Esterilizar em autoclave.
- Deixar o tubo esfriar na posição vertical.

Reagentes para revelação da reação.

■ Solução A

- Dissolver o ácido sulfanílico em uma parte do ácido e depois completar com o restante do ácido acético q.s.p. 100 mL.

■ Solução B

- Dissolver o N,N-dimetil-l-naftilamina com uma parte do ácido e completar o restante do ácido acético q.s.p. 100 mL.

3.12.5 Controle de qualidade

Resultado	Cepa	Resultado esperado
Nitrato reduzido a nitrito	Enterobactérias	Coloração vermelha
Nitrato a gás	Pseudomonas aeruginosa	Bolhas no tubo de Durhan
Nitrato não reduzido	Acinetobacter baumannii	Coloração vermelha somente após adição de pó de zinco

3.12.6 Inoculação

- Fazer um inóculo denso, com colônias recentes (18 – 24 horas) no meio com alça bacteriológica.
- Não agitar o tubo após inoculação.
- Incubar $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 a 48 horas, sendo necessário algumas vezes até 5 dias.
- Verificar se existe crescimento aparente no meio antes de colocar os reagentes para revelar a Reação.
- Verificar a presença de bolhas dentro do tubo de Durhan.

3.12.7 Interpretação

- Cor original do meio: incolor a palha.

- Verificar se há bolhas de gás dentro do tubo de Durham, se houver significa que a bactéria reduziu nitrato a gás = denitrificação.
- Adicionar 5 gotas dos reagentes A e B no meio, sem homogeneizar. Se houver desenvolvimento de cor vermelho tijolo significa que a bactéria reduziu nitrato a nitrito.
- Se após a adição dos reagentes A e B o tubo continuar incolor, adicionar uma pitada de pó de zinco no tubo, se houver desenvolvimento de cor vermelho tijolo significa que a bactéria não reduziu nitrato a nitrito e o nitrato ainda permanece no meio.
- **IMPORTANTE:** algumas bactérias não conseguem reduzir nitrato a nitrito e só conseguem reduzir nitrito, como por exemplo, *Alcaligenes Faecalis* e *Oligella Uretralis*, havendo a necessidade de utilizar o caldo nitrito para esse fim.

RESULTADO	REAGENTES A e B	PÓ DE ZINCO	GÁS NO TUBO DE DURHAN
Reduziu nitrato a nitrito	Pos	Não houve reação	Não houve reação
Não reduziu nitrato a nitrito	NEG	Pos	NEG
Nitrato reduzido a gás	NEG	NEG	POS

3.12.8 Conservação e validade

- Caldo nitrato: conservar o meio de 4 a 8°C por até 3 meses.
- Soluções A e B: guardar em frasco escuro na geladeira (4 a 8°C) por até 12 meses.
- Ácido acético 5N: Conservar de 4 a 8°C por até 12 meses.

3.12.9 Recomendações

- Utilizar o tubo de nitrato sem inocular como controle negativo, para evitar resultado falso positivo, devido à alta sensibilidade do teste.
- Quando for adicionado o pó de zinco, não colocar em excesso, pode resultar em falso negativo (incolor).

3.13 Meio Base Para Oxidação e Fermentação – OF

3.13.1 Princípio

- Verificar a capacidade do micro-organismo em utilizar os carboidratos pela via oxidativa ou fermentativa.

3.13.2 Utilidade

- Diferenciar bacilos Gram-negativos quanto ao tipo de metabolismo empregado em utilizar carboidratos.

3.13.3 Fórmula/Produto

- Meio comercial: Meio base de OF.
- Carboidratos (dextrose ou glicose, lactose, sacarose, xilose, maltose, manitol etc).
- Vaselina líquida estéril.

3.13.4 Procedimentos

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante.
- Aquecer o meio até dissolver todo o Ágar.
- Separar volumes iguais em diferentes Béquer, dependendo do número de carboidratos que serão preparados.
- Adicionar 1g do carboidrato para cada 100 mL de meio base e homogeneizar.
- Distribuir 2 mL em tubos com tampa de rosca.
- Esterilizar em vapor fluente por 20 minutos (deixar a válvula de pressão da autoclave aberta e, quando estiver saindo bastante vapor, começar marcar o tempo. Vapor fluente só pode ser feito em autoclave com tampas reguláveis para saída de vapor. Autoclaves horizontais não possuem controle de saída de vapor, são automáticas).
- Pode-se também esterilizar a base e adicionar os açúcares esterilizados por filtração em filtros Millipore 0,45 0,22µm (90 mL de base autoclavada e 10 mL de açúcar esterilizado por filtração).
- Deixar esfriar a temperatura ambiente na posição vertical.

3.13.5 Controle de qualidade

RESULTADO	CEPA	Resultado Esperado
OF-GLICOSE Oxidador Fermentador Inalterado	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Alcaligenes faecalis</i> *	A-amarelo, F-inalterado A/F-amarelo A/F-inalterado
OF-FRUTOSE Oxidador Fermentador Inalterado	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Alcaligenes faecalis</i> *	A-amarelo, F-inalterado A/F-amarelo A/F-inalterado
OF-LACTOSE Oxidador Fermentador Inalterado	<i>Burkholderia cepacia</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Alcaligenes faecalis</i> *	A-amarelo, F-inalterado A/F-amarelo A/F-inalterado
OF-MALTOSE Oxidador Fermentador Inalterado	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Alcaligenes faecalis</i> *	A-amarelo, F-inalterado A/F-amarelo A/F-inalterado

RESULTADO	CEPA	Resultado Esperado
OF-MANITOL Oxidador Fermentador Inalterado	<i>Burkholderia cepacia</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Alcaligenes faecalis</i> *	A-amarelo, F-inalterado A/F-amarelo A/F-inalterado
OF-SACAROSE Oxidador Fermentador Inalterado	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Alcaligenes faecalis</i> *	A-amarelo, F-inalterado A/F-amarelo A/F-inalterado
OF-XILOSE Oxidador Fermentador Inalterado	<i>Burkholderia cepacia</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Alcaligenes faecalis</i> *	A-amarelo, F-inalterado A/F-amarelo A/F-inalterado

A= tubo aberto; F= tubo fechado com vaselina líquida

Pseudomonas aeruginosa ATCC 10145, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883

* *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750 ou *Moraxella catarrhalis* ATCC 25238

3.13.6 Inoculação

- Inocular densamente até o fundo do tubo com a agulha bacteriológica, colônias provenientes de uma placa de crescimento de 18 a 24 h.
- Inocular dois tubos, em um dos tubos acrescentar 1,0 mL de vaselina líquida estéril, no outro tubo não colocar vaselina.
- Incubar a temperatura de 35°C por 48 horas ou mais.
- Se resultado negativo, pode ser necessário até 4 dias, excepcionalmente 14 dias, observando diariamente.

3.13.7 Interpretação

- Cor original do meio: verde.
- Oxidador: tubo aberto – desenvolvimento de cor amarela.
- Tubo fechado – inalterado (verde).
- Fermentador: tubo aberto e fechado – desenvolvimento de cor amarela.
- Assacarolítico: tubo aberto e fechado – inalterado (verde).

3.13.8 Conservação e validade

- Conservar de 4 a 8°C por até 6 meses.

3.13.9 Recomendações

- Sempre antes de interpretar a reação verificar se há crescimento nos tubos, porque algumas bactérias não crescem no meio OF, sendo necessário enriquecimento do meio, acrescentando 2% de soro de coelho ou cavalo.
- Importante deixar tampa frouxa no tubo aberto.

3.14 M.E.V.A.G. (Milieu pour l'étude de la voie d'attaque des glucides – Hugh & Leifson, 1953)

As bactérias podem utilizar os açúcares por 2 diferentes vias metabólicas:

- 1) Via fermentativa – reações que podem ocorrer na ausência de oxigênio. Os ácidos que se acumulam, como produtos de degradação, abaixam sensivelmente o pH do meio.
- 2) Via oxidativa – o oxigênio do ar é obrigatoriamente utilizado, e ácidos são formados.

O Mevag é usado para o estudo dos açúcares que são utilizados pelas bactérias oxidativas. Também pode ser utilizado para a determinação da via de ataque da glicose.

Caldo Comum	50 mL	25 mL	100 mL
KCl	5 g	2,5 g	10 g
Ágar	3 g	1,5 g	6 g
Vermelho de fenol a 0,2%	10 mL	5 mL	20 mL
H ₂ O destilada q.s.p.	1000 mL	500 mL	2000 mL

Fórmula:

pH = 7,6-7,8

Distribuir em frascos.

Extrato de carne	0,5 g	2,5 g
Peptona	1 g	5 g
NaCl	0,5 g	2 g
H ₂ O dest.	100 mL	500 mL

Esterilizar a 121°C por 15 min.

Caldo comum

Distribuir em tubos de 12 x 120mm.

Autoclavar a 121°C/15 min.

Solução vermelho de fenol a 0,2%

Vermelho de fenol	0,2 g
H ₂ O destilada estéril	100 mL

Utilizar NaOH para uma melhor dissolução.

Dissolver o vermelho de fenol aos poucos na água.

3.15 Ágar TSI – Triplo Açúcar Ferro

3.15.1 Princípio

- Este meio contém três açúcares: 0,1% glicose, 1,0% lactose, 1,0% sacarose, vermelho de fenol para detecção da fermentação de carboidratos e sulfato de ferro para detecção da produção de sulfato de hidrogênio (indicado pela cor preta na base do tubo).
- A fermentação é indicada pela mudança da cor do indicador de pH de vermelho para amarelo. O Ágar fundido é deixado solidificar, formando uma superfície inclinada.
- Essa configuração origina duas câmaras de reação dentro do mesmo tubo. A porção inclinada ou bico, exposta em toda sua superfície ao oxigênio atmosférico, é aeróbia. A porção inferior, denominada profundidade ou fundo, está protegida do ar e é relativamente anaeróbia.
- Quando se prepara o meio, é importante que o bico e a profundidade tenham o comprimento igual ao redor de 3 cm cada um, de modo que o efeito das duas câmaras seja conservado.

3.15.2 Utilidade

- Diferenciar bacilos Gram-negativos com base na fermentação de carboidratos, produção de sulfato de hidrogênio e gás.

3.15.3 Fórmula/Produto

- Meio comercial: TSI (tríplice açúcar ferro).

3.15.4 Procedimentos

- Pesar o TSI conforme instruções do fabricante.
- Ajustar o pH para $7,3 \pm 0,2$.
- Distribuir em tubos com tampas de rosca.
- Esterilizar em autoclave.
- Retirar os tubos da autoclave e incliná-los ainda quentes para que solidifiquem com a superfície em forma de bico de flauta (ângulo de 45°).
- Deixar solidificar em temperatura ambiente.

3.15.5 Controle de qualidade

MICROORGANISMO	ATCC	SUPERFÍCIE	BASE	H ₂ S
<i>Escherichia coli</i>	25922	Ácido	Ácido, gás	Neg
<i>Shigella flexneri</i>	12022	Alcalino	Ácido	Neg
<i>Edwardsiella tarda</i>	15947	Alcalino	Ácido	Pos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	Alcalino	Alcalino	Neg

3.15.6 Inoculação

- Inocular colônia pura de 18 a 24 horas.
- Semear por picada até o fundo e na superfície do meio.
- Incubar 24 h a 35°C, com a tampa semiaberta.

3.15.7 Interpretação

- Cor original do meio: vermelho laranja, levemente opalescente.
- Leitura: entre 18 e 24 horas.
- Cor púrpura = alcalino.
- Cor amarelo = ácido.

Reações ápice/base:

- Púrpura/amarelo = fermentação apenas da glicose (lactose e sacarose negativos).
- Amarelo/amarelo = fermentação da glicose + lactose e/ou sacarose (2 ou 3 açúcares).
- Presença de gás (CO₂) = bolhas ou meio fragmentado.
- H₂S positivo = presença de precipitado negro.
- Pos.: positivo; Neg.: negativo; V.: variável.

3.15.8 Conservação e validade

- Conservar por até 6 meses de 2 a 8°C.

ÁPICE	BASE	H ₂ S	GÁS	Interpretação mais provável
Vermelho	Vermelho	Neg	Neg	Sem crescimento: bactéria exigente
Vermelho	Vermelho	Neg	Neg	Crescimento na superfície: não fermentador ou Gram +
Amarelo	Vermelho	Neg	Neg	Crescimento na superfície: Gram + ou esquecimento de picar a base
Amarelo	Amarelo	Neg	V	Enterobactérias ou <i>Aeromonas</i> Lac neg
Amarelo	Amarelo	Pos	V	<i>Salmonella</i> , <i>Proteus</i> , <i>Morganella</i> , Providência e <i>Citrobacter</i>

3.15.9 Recomendações

- Quando há produção de H₂S significa que a base é sempre ácida.
- Não realizar leitura com menos de 18 ou mais de 24 horas, podendo resultar em falsas reações.
- Não utilizar alças bacteriológicas para não fragmentar o meio, ocasionando falsa reação de gás, utilizar fio bacteriológico.
- Qualquer traço de escurecimento no meio deve ser indicado com H₂S positivo.

3.16 Ágar Base Uréia (Christensen)

3.16.1 Princípio

- Determinar a habilidade do micro-organismo de degradar a ureia em duas moléculas de amônia pela ação da enzima urease, resultando na alcalinização do meio.

3.16.2 Utilidade

- Bacilos Gram-negativos fermentadores e não fermentadores, *Staphylococcus* e *Haemophilus*.

3.16.3 Fórmula/Produto

- Meio comercial: Ágar Base Uréia.
- Solução de ureia a 40% (40 g ureia + 100 mL de água destilada).

3.16.4 Procedimentos

- Pesar e hidratar o meio de ureia conforme instruções do fabricante.
- Esterilizar em autoclave.
- Resfriar até 50°C e adicionar assepticamente 5 mL da solução de ureia a 40% em 95 mL do meio base.
- Homogeneizar e distribuir 3 mL do meio assepticamente em tubos estéreis com tampa de rosca.
- Inclinar os tubos ainda quentes para que solidifiquem com a superfície em forma de bico de flauta (ângulo de 45°). Deixar solidificar em temperatura ambiente.
- Obs.: A solução de ureia a 40% é uma solução hipertônica e o risco de contaminação é baixo, porém, pode-se esterilizar a solução por filtração (filtro Millipore de 0,22 µm).

3.16.5 Controle de qualidade

- **Esterilidade:** colocar 100% do lote preparado na estufa 35 ±1°C por 24 horas. Se não houver mudança de cor liberar para uso.
- Positivo: *Proteus vulgaris* ATCC 13315.
- Negativo: *Escherichia coli* ATCC 25922.

3.16.6 Inoculação

- Inocular colônia pura de 18 a 24 horas.
- Fazer um inóculo denso.
- Semear na superfície do meio, não picar a base, pois a base pode servir como controle.
- Incubar 35°C de 6 a 24 horas, podendo ser necessário até 6 dias.

3.16.7 Interpretação

- Cor original do meio: amarelo palha.
- Positivo: alteração do meio para cor de rosa, pink.
- Negativo: sem alteração de cor do meio.

A) Diferentes graus de hidrólise da ureia podem ocorrer:

- Tubo inteiro cor pink.
- Superfície do tubo cor pink, base não muda de cor.
- Fracamente positivo: ápice cor pink, restante do tubo não muda de cor.
- Positivo rápido: 1 – 6 horas para *Proteus* spp.
- Positivo tardio: 24 horas a 6 dias ou mais tempo de incubação. Ex: algumas cepas de *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Haemophilus*.

3.16.8 Conservação e validade

- Conservar de 4 a 8°C por até 6 meses.
- Após esse período realizar controle negativo e positivo semanalmente.

3.16.9 Recomendações

- Não aquecer a solução base da ureia, pois a ureia pode se decompor se aquecida.
- Não utilizar a ureia de Stuart porque é menos sensível para detectar a presença de urease.
- Não deixar o meio em temperatura ambiente pode ocorrer autohidrólise.

Capítulo 4:

Produtos para Provas de Identificação

Rosângela Aparecida Mendes Silva
Maria Carmen Gonçalves Lopes
Julia Taeko Utiyama Yoshida

4.1 Prova de catalase

4.1.1 Princípio

- A catalase é uma enzima que decompõe o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água e oxigênio.

4.1.2 Utilidade

- Para *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Moraxella catarrhalis*.

4.1.3 Fórmula/Produto

- Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) 3%.

4.1.4 Controle de qualidade

- Positivo: cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ou *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.
- Negativo: cepa de *Streptococcus do grupo viridans* ou *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305.

4.1.5 Conservação e validade

- Peróxido de hidrogênio deve ser mantido em local seco, ao abrigo de luz e calor.
- Validade: ver recomendações do fabricante.

4.1.6 Inoculação

- Colocar uma gota de peróxido de hidrogênio (água oxigenada) 3% sobre uma lâmina.

- Com auxílio de fio bacteriológico, agregar a colônia em estudo na gota de peróxido de hidrogênio.

4.1.7 Interpretação

- Positivo: Presença imediata de bolhas – a produção de efervescência indica a conversão do H_2O_2 em água e oxigênio gasoso.
- Negativo: Ausência de bolhas ou efervescência.

4.1.8 Recomendações

- Evitar o uso de meios contendo sangue, pois os eritrócitos podem produzir reação fraca de catalase.
- Para uso de outra cepa de *Staphylococcus* para o controle positivo, não usar cepas de *Staphylococcus saccharolyticus* e *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius*, pois são catalase negativos.

4.2 Prova de coagulase

4.2.1 Princípio

- Verificar a capacidade de micro-organismos reagirem com o plasma e formarem um coágulo, uma vez que a coagulase é uma proteína com atividade similar à protrombina, capaz de converter o fibrinogênio em fibrina, que resulta na formação de um coágulo visível.
- Pode ser encontrada em duas formas que possuem diferentes propriedades: coagulase conjugada e coagulase livre.
- **A coagulase conjugada** (prova em lâmina) é também conhecida como fator de aglutinação, encontra-se unida à parede celular bacteriana e não está presente em filtrados de cultivos.

Quando as células bacterianas são suspensas em plasma (fibrinogênio), formam-se cordões de fibrina entre elas, o que causa agrupamento sob a forma de grumos visíveis.

- **A coagulase livre** (prova em tubo) é uma substância similar à trombina e está presente em filtrados de cultivos. É secretada extracelularmente e reage com uma substância presente no plasma denominado Fator de Reação com a Coagulase – CRF, para formar um complexo que, por sua vez, reage com fibrinogênio, formando fibrina (coágulos).
- Quando uma suspensão em plasma do micro-organismo produtor de coagulase é preparada em tubo de ensaio, forma-se um coágulo visível após o período de incubação.

4.2.2 Utilidade

- Separar as espécies de *Staphylococcus* de importância clínica, *S. aureus* – coagulase positiva, das demais espécies – coagulase negativa.

4.2.3 Fórmula/Produto

- Plasma de coelho com EDTA liofilizado.

4.2.4 Controle de qualidade

- Positivo: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- Negativo: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

4.2.5 Conservação e validade

- Plasma antes e depois de reconstituído, deve ser mantido refrigerado.
- Validade: ver recomendações do fabricante.

4.2.6 Inoculação

A) Coagulase conjugada:

- Traçar dois círculos com lápis de cera em uma lâmina de vidro.
- Colocar duas gotas de água destilada ou solução fisiológica estéreis dentro de cada círculo.
- Com auxílio de um fio bacteriológico agregar a colônia em estudo, homogeneizando delicadamente em cada círculo.
- Colocar uma gota de plasma para a prova de coagulase em um dos círculos.
- No outro círculo, adicionar outra gota de água destilada ou solução fisiológica estéreis, como controle.
- Homogeneizar com palito de madeira.
- Inclinar a lâmina delicadamente, para frente e para trás.
- Observar presença de aglutinação.

B) Coagulase livre:

- Com auxílio do fio bacteriológico, suspender colônias em estudo em caldo BHI e colocar em estufa à 37°C até que turve.
- Se necessário, acertar a turbidez até 0,5 da escala de MacFarland.
- Em um tubo de ensaio estéril, colocar 0,5 mL de plasma reconstituído e 0,5 mL do caldo BHI com crescimento bacteriano recém turvado.
- Incubar em estufa à 35°C 4 horas.
- Verificar se há presença de coágulo.
- Se não houver presença de coágulo, incubar o tubo em temperatura ambiente e repetir as leituras com 18 e 24 horas de incubação.

4.2.7 Interpretação

A) Coagulase conjugada:

- Positiva: formação de precipitado branco e aglutinação dos micro-organismos da suspensão, após 15 segundos, no círculo que contém o plasma.
- Negativa: ausência de aglutinação no círculo que contém o plasma.
- Controle sem plasma: deverá ser leitoso e uniforme, sem presença de precipitado ou aglutinação.
- A presença de precipitado ou aglutinação torna a prova inespecífica, devendo ser repetida a prova em tubo.

B) Coagulase livre:

- Positiva: presença de qualquer grau de coágulo.
- Negativa: ausência de coágulo.

4.2.8 Recomendações

- Para a coagulase em tubo, as provas negativas após 4 horas a 37°C, os tubos devem ser mantidos em temperatura ambiente, pois a incubação prolongada a 37°C podem produzir fibronolisinas, o que causa dissolução do coágulo durante a incubação.
- Durante a leitura inclinar o tubo delicadamente e não agitar, pois a agitação pode desmanchar os coágulos parcialmente formados.
- Recomenda-se o uso de plasma de coelho com EDTA.
- Não utilizar plasma citratado, pois os micro-organismos capazes de metabolizar o citrato (como os *Enterococcus*), darão resultados positivos se, forem confundidos com estafilococos.
- Plasma humano não é recomendado, pois contém quantidades variadas de Fator de Reação com a Coagulase e de anticorpos antiestafilococos, podendo dar uma prova falso/negativa.

4.3 Prova de gelatinase

4.3.1 Princípio

- Determina a habilidade do micro-organismo de produzir enzimas proteolíticas (gelatinase) que liquefaz/hidrolisa gelatina.

4.3.2 Utilidade

- Identificar e classificar bactérias fermentadoras, não fermentadoras e bacilos Gram-positivos esporulados.

4.3.3 Fórmula/Produto

- Filme não revelado de Raio X.
- Salina 0,9 % estéril ou água destilada estéril.

4.3.4 Procedimentos

- Cortar a fita de filme de Raio X em tamanhos de aproximadamente 5 mm X 1 cm.
- Armazenar em frasco estéril.

4.3.5 Controle de qualidade

- Positivo: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.
- Negativo: *Escherichia coli* ATCC 25922.

4.3.6 Inoculação

- Em um tubo 13 x 100 mm, colocar 1,0 mL de salina 0,9% estéril ou água destilada estéril.
- Com o auxílio de uma alça bacteriológica, fazer um inóculo denso da bactéria a ser testada, adicionar uma fita de Raio x. Fazer o inóculo de colônias de crescimento de 18 a 24 horas.
- Realizar um tubo controle, com salina 0,9% estéril ou água destilada estéril e a fita de Raio X, sem inóculo.

4.3.7 Interpretação

- Positivo: emulsão de gelatina (cor verde) na porção submersa do filme torna-se transparente (clara).
- Negativo: fita permanece verde, emulsão esverdeada permanece na porção submersa do filme.

4.3.8 Conservação e validade

- Fitas: seguir instruções do fabricante.

4.3.9 Recomendações

- Utilizar filme de Raio X não revelado.

4.4 Prova de Lecitinase

4.4.1 Princípio

- Cepas produtoras de lecitinase produzem zona opaca ao redor do inóculo.

4.4.2 Utilidade

- Diferenciação de espécies de *Bacillus* e *Clostridium*.

4.4.3 Fórmula/Produto

A) Fórmula – meio base:

- Gema de ovo de galinha depende do volume de meio base a ser utilizado
- Proteose de peptona nº 2 40 g
- Fosfato dissódico 5 g
- Fosfato de potássio 1 g
- Cloreto de sódio 2 g
- Sulfato de magnésio 0,1 g
- Glicose 2 g
- Solução de hemina (5 mg/mL) 1 mL
- Ágar 20 g
- Água destilada 1000 mL
- pH: 7,6

B) Solução de gema de ovo a 50%:

- Gema de ovo 1 mL
- Solução fisiológica estéril 1 mL

4.4.4 Procedimentos

A) Meio base:

- Pesar e hidratar todos os componentes, exceto a solução de gema de ovo.
- Aquecer em bico de Bunsen até fundir o Ágar.
- Distribuir 20 mL por tubo.
- Esterilizar em autoclave.

B) Meio para uso:

- Resfriar a 50°C e adicionar 1 mL da solução de gema de ovo a 50%.
- Homogeneizar bem e distribuir em placas de Petri de 90 mm.

4.4.5 Controle de qualidade

- Positivo: *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* ATCC 13124.
- Negativo: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Clostridium difficile* ATCC 9689.

4.4.6 Conservação e validade

- Meio base (para estoque): 4 a 8°C fechado, durante 6 meses.
- Meio para uso: 4 a 8°C, embalado, durante 1 semana.

4.4.7 Inoculação

- Com auxílio de um fio bacteriológico, tocar nas colônias em estudo e fazer um esfregaço circular e denso sobre a superfície do meio.
- Incubar à 37°C 24 horas em aerobiose – para cepas de *Bacillus* spp.
- Incubar à 37°C 48 horas em anaerobiose – para cepas de *Clostridium* spp.

4.4.8 Interpretação

- Cor original do meio: amarelo.
- Positivo: formação de halo branco ao redor das colônias.
- Negativo: ausência de halo, meio fica inalterada.

4.4.9 Recomendações

- Não usar ovos velhos.
- Não usar meio vencido.

4.5 Prova de oxidase

4.5.1 Princípio

- O teste de oxidase é baseado na produção intracelular da enzima oxidase pela bactéria.

4.5.2 Utilidade

- Ajuda caracterizar espécies de *Neisseria* e diferenciar não fermentadores (oxidase positiva) de enterobactérias (oxidase negativa). Diferencia algumas bactérias fermentadoras oxidase positiva entre elas *Plesiomonas shigelloides*, *Aeromonas* spp. e *Vibrio* spp.

4.5.3 Fórmula/Produto

- Reativo para teste de oxidase preparado no laboratório:
 - N,N,N,N-tetrametil-p-fenileno diamina mono-hidrocloridrato 1g
 - Água destilada 100 mL
- Tiras impregnadas com o reativo (comercial pronto para uso).
- Reativo de oxidase em ampolas (comercial pronto para uso), para ser revelado em papel de filtro.

4.5.4 Procedimentos

A) Reativo para teste de oxidase:

- Pesar 1g. de N,N,N,N-tetrametil-p-fenileno diamina mono-hidrocloridrato em um Béquer e adicionar 100 mL água destilada, vagarosamente para não oxidar a solução.

- Colocar o papel de filtro cortado em tiras dentro do Béquer com o reativo.
- Deixar o papel de filtro absorver o reativo. Desprezar o reativo que sobrou.
- Colocar o papel na estufa a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ para secar. Deixar o papel pendurado sobre um Béquer para juntar o excesso de reativo.
- Cortar a fita em tamanhos menores e guardar em frasco escuro.

Obs.: Não utilizar luvas para fazer o procedimento de preparo e corte das fitas.

4.5.5 Controle de qualidade

- Positivo: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (desenvolvimento de cor roxa).
- Negativo: *Escherichia coli* ATCC 25922 (sem alteração da cor).

4.5.6 Inoculação

- Com auxílio de um palito de madeira ou plástico, espalhar a colônia a ser testada sobre a fita de oxidase.
- **Observar se há formação de cor roxa de imediato.**

4.5.7 Interpretação

- Cor original: branca ou levemente azulada.
- Oxidase positiva: produção de cor roxa imediatamente no local da inoculação da bactéria.
- Oxidase negativa: não há mudança da cor do papel no local da inoculação da bactéria.
- **Não considerar alteração de cor tardia.**

4.5.8 Conservação e validade

- Fitas: 3 meses, quando conservadas em frasco escuro de 4 a 8°C.
- Reativo: deve ser preparado no momento de impregnar as fitas.

4.5.9 Recomendações

- Não fazer o teste de colônias de crescimento de meios que contenham glicose, a fermentação inibe a atividade da oxidase, podendo resultar em falso negativo.
- Não fazer teste de oxidase de colônias de crescimento de meios seletivos (Mac Conkey, XLD, EMB).
- Não usar alça ou agulha porque pode conter traços de ferro, podendo oxidar a fita e resultar em falso positivo.
- Utilizar colônias de meios não seletivos tais como: Ágar sangue e Ágar chocolate.

- Os reagentes para oxidase, se auto oxidam rapidamente com o ar, perdendo a sensibilidade.
- Não cortar o papel de filtro com tesoura, pois podem conter traços de ferro.

4.6 Fermentação de carboidratos

4.6.1 Princípio

- A fermentação de carboidratos é amplamente utilizada para a diferenciação de gêneros e identificação de espécies bacterianas.
- A prova consiste em verificar a capacidade de o micro-organismo fermentar ou não um determinado carboidrato, permitindo assim verificar as suas características que auxiliaram na identificação.

4.6.2 Utilidade

- Identificar e separar espécies de *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus coagulase negativa*.

4.6.3 Fórmula/Produto

- Produto: Caldo para fermentação de carboidratos.
- Carboidratos mais utilizados: arabinose, sorbitol, rafinose, trealose, manitol, entre outros.
- Fórmula (base): (O **BHI caldo** comercial é o Brain Heart Infusion Broth que contém glicose na sua composição. Usar o termo **BHI caldo sem glicose** ou **HIB-Heart Infusion Broth** que são os caldos indicados para prova de fermentação de carboidratos):
 - BHI caldo 22,5 g
 - Carboidrato 10 g
 - Indicador * 1 mL Água destilada 200 mL
 - Água destilada 900 mL
 - * Indicador púrpura de bromocresol:
 - Púrpura de bromocresol 1,6 g
 - Etanol a 95% 100 mL
- Meio comercial: Caldo Base Vermelho de Fenol.

4.6.4 Procedimentos (meio comercial):

- Esterilizar os carboidratos, separadamente, por filtração e reservar.
- Pesar o BHI em béquer, acrescentar a água e homogeneizar bem.
- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante.
- Adicionar o indicador e homogeneizar novamente.
- Esterilizar em autoclave.

- Após esfriar a base, adicionar o carboidrato esterilizado por filtração.
- Distribuir 3 mL por tubo.

4.6.5 Controle de qualidade

CARBOIDRATOS	POSITIVO	NEGATIVO
Arabinose	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
Rafinose	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
Sorbitol	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus gallinarum</i>
Maltose	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus schleiferi</i>
Trealose	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

4.6.6 Conservação e validade

- Conservar entre 4 a 10 °C por 3 meses.

4.6.7 Inoculação

- Dissolver as colônias no caldo.
- Incubar à 35°C 24 horas.

4.6.8 Interpretação (meio comercial):

- Cor original do meio: púrpura.
- Positivo: Crescimento bacteriano (turvação do meio) com viragem do indicador para amarelo.
- Negativo: Ausência de crescimento. O meio permanece com a cor original, púrpura e sem turvação.
- Cor original do meio: alaranjado.
- Positivo: crescimento bacteriano (turvação do meio) com viragem do indicador para amarelo.
- Negativo: ausência de crescimento. O meio permanece com a cor original, alaranjado e sem turvação.

4.6.9 Recomendações

- Para provas negativas, incubar um período maior (48 horas).
- Não autoclavar a base com o carboidrato, pois a alta temperatura pode degradar o carboidrato.

4.7 Prova PYR

4.7.1 Princípio

- A prova de hidrólise PYR é um teste enzimático que consiste na hidrólise do substrato L-pyrrolidonyl-alfa-naftylamide por uma enzima bacteriana,

a L-pyroglutamyl-aminopeptidase. A hidrólise do substrato libera β -naphthylamide, que é detectada com a adição do reagente, o N,N dimetilaminocinamaldeído, que forma uma base de Schiff, de coloração vermelha.

4.7.2 Utilidade

- Teste presuntivo para identificar *Streptococcus beta hemolítico presumível do grupo A de Lancefield (S. pyogenes)* e *Enterococcus spp.*
- Identificação de algumas espécies *Staphylococcus coagulase negativa*.
- Identificação de bacilos Gram-negativos não fermentadores.

4.7.3 Fórmula/Produto

- Teste comercial: PYR test.
- Fórmula – Caldo base de PYR (caldo de Todd-Hewitt):
 - Mod IV – 50
 - BHI caldo 500 g
 - Neopeptona 20 g
 - Dextrose 2 g
 - Cloreto de sódio 2 g
 - Fosfato dissódico 0,4 g
 - Carbonato de sódio 2,5 g
 - Água destilada 1000 mL

Para cada 100 mL de caldo base, adicionar 0,01 mL de L-pyrrolidonyl-alfa-naftylamide.

Reagente de PYR comercial: N,N-dimetilaminocinamaldeído a 0,01%.

4.7.4 Procedimentos

- Pesar os componentes em béquer.
- Adicionar a água e homogeneizar bem até completa dissolução.
- Adicionar o L-pyrrolidonyl-alfa-naftylamide e homogeneizar novamente.
- Distribuir 0,2 mL por tubo.
- Esterilizar em autoclave.

4.7.5 Controle de qualidade

- Positivo: *Streptococcus beta hemolítico presumível do grupo A de Lancefield (S. pyogenes ATCC 19615)* ou *Enterococcus faecalis ATCC 29212*.
- Negativo: *Streptococcus do grupo viridans* ou *Streptococcus pneumoniae*.

4.7.6 Conservação e validade

- Conservar embalado de 4 a 8°C por até 3 meses.
- Comercial: ver instruções do fabricante

4.7.7 Inoculação

- Dissolver as colônias no caldo OU.
- No caso de usar kits comerciais, com auxílio de uma pinça flambada, colocar um disco impregnado com o substrato de PYR sobre as colônias em estudo recém-isoladas.
- Incubar à 37°C por 4 horas; ver instruções do fabricante de produtos comercializados.
- Adicionar 1 gota do reagente PYR (se caldo) OU.
- Retirar o disco e colocar sobre uma lâmina e adicionar 1 gota do reagente PYR.

4.7.8 Interpretação

- Positivo: Desenvolvimento de cor vermelho cereja em 1 minuto (após adicionar o reagente de PYR).
- Negativo: Sem alteração de cor (permanece amarela ou alaranjada).

4.7.9 Recomendações

- Para identificações presuntivas do *Streptococcus pyogenes* ou de *Enterococcus* spp., confirmar se realmente são cocos Gram-positivos/catalase negativos, pois algumas cepas de *Staphylococcus* spp., *Aerococos* e *Arca-nobacterium haemolyticum*, podem ser PYR positivos.
- Raras cepas de *Enterococcus* spp. podem ser catalase positiva, confirmar com outras provas (como bÍlis esculina) tratar de enterococo ou não.
- Não utilizar colônias com crescimento superior a 24 horas, culturas velhas podem dar resultado falso – negativo.
- Não exceder o tempo de leitura.

4.8 Crescimento a 42 E 44°C

4.8.1 PrincÍpio

- Verificar a capacidade de o micro-organismo crescer em altas temperaturas.

4.8.2 Utilidade

- Identificação de bacilos Gram-negativos não fermentadores.

4.8.3 Fórmula/Produto

- Meio comercial: Caldo BHI (infusão de cérebro e coração).
- Indicador pÚrpura de bromotimol (1,6 g de do indicador em 100 mL de álcool etÍlico 95%).

4.8.4 Procedimentos

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante.
- Distribuir 3,0 mL em tubos com tampa de rosca.
- Acrescentar o indicador púrpura de bromotimol (1 mL de indicador em 1000 mL de meio).
- Esterilizar em autoclave.
- Retirar os tubos da autoclave e deixar esfriar em temperatura ambiente.

4.8.5 Controle de qualidade

- Temperatura 42°C: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.
- Temperatura 44°C: *Acinetobacter baumannii*.

4.8.6 Inoculação

- Com o auxílio de uma alça ou fio bacteriológico, inocular a colônia a ser testada.
- Realizar o teste com colônias puras de 18 a 24 horas.
- Incubar em banho maria na temperatura a ser testada, 42°C ou 44°C.

4.8.7 Interpretação

- Cor original do meio: púrpura.
- Positivo: presença de turvação e viragem do indicador de cor púrpura para amarelo = crescimento bacteriano.
- Negativo: ausência de turvação e permanência da cor púrpura = ausência de crescimento bacteriano.

4.8.8 Conservação e validade

- Conservar por até 6 meses de 2 a 8°C.

4.8.9 Recomendações

- Não fazer inóculo muito denso, pode resultar em falsa turvação.
- Importante o controle da temperatura do banho, com termômetro de máxima e mínima.

4.9 Teste de motilidade

4.9.1 Princípio

- A bactéria é móvel através do seu flagelo. Flagelos ocorrem nos bacilos Gram-negativos, poucas formas de cocos são móveis. A bactéria pode conter um ou muitos flagelos e sua localização varia com a espécie da bactéria e as condições de cultura.

4.9.2 Utilidade

- Determinar se o micro-organismo é ou não móvel.
- Meios associados a outros testes: Meios SIM (Sulfato, Indol, Motilidade), MILI (Motilidade, Indol, Lisina), MIO (Motilidade, Indol, Ornitina) utilizados para testes enterobactérias.
- Meio motilidade em caldo utilizado para não fermentadores e *Enterobacter cloacae* (em casos de dúvidas).

4.9.3 Fórmula/Produto

- Meio comercial: Motilidade
- Meio comercial: SIM
- Meio comercial: MILI
- Meio comercial: MIO
- Meio Comercial: BHI (brain heart infusion)
- Meio Comercial: Triptona
- Solução de Vermelho de Tetrazólio.

4.9.4 Procedimentos

A) Meio Motilidade:

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante.
- Aquecer sob agitação, até fundir o meio.
- Distribuir aproximadamente 2,0 mL em tubos com tampas de rosca.
- Esterilizar em autoclave.
- Retirar os tubos da autoclave.
- Deixar solidificar em temperatura ambiente na posição vertical.

B) Meio Motilidade com adição da solução de Vermelho de Tetrazólio:

- Pesar e hidratar conforme instruções do fabricante.
- Aquecer sob agitação, até fundir o meio.
- Adicionar 0,1 mL para cada 100 mL de base de solução de vermelho de tetrazólio 0,1% e homogeneizar bem.
- Distribuir aproximadamente 2,0 mL em tubos com tampa de rosca.
- Esterilizar em autoclave.
- Retirar os tubos da autoclave.
- Deixar solidificar em temperatura ambiente na posição vertical.

C) Meio SIM/Meio MILI/Meio MIO

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante.
- Aquecer sob agitação, até fundir o meio.
- Distribuir aproximadamente 3,0 mL em tubos com tampa de rosca.
- Esterilizar em autoclave.

- Retirar os tubos da autoclave.
- Deixar solidificar em temperatura ambiente na posição vertical.

D) Caldo BHI (motilidade em caldo)

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante.
- Distribuir 3,0 mL em tubos com tampa de rosca.
- Esterilizar em autoclave.
- Retirar os tubos da autoclave.
- Deixar esfriar em temperatura ambiente.

E) Meio Caldo Triptona

- Pesar e hidratar conforme instruções do fabricante.
- Aquecer sob agitação, até fundir o meio.
- Distribuir aproximadamente 3,0 mL em tubos com tampas de rosca.
- Esterilizar em autoclave.
- Retirar os tubos da autoclave.
- Deixar esfriar em temperatura ambiente.

4.9.5 Controle de qualidade

A) Meio Motilidade:

- Positivo: *Escherichia coli* ATCC 25922.
- Negativo: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

B) Meio SIM:

MICROORGANISMO	H ₂ S	INDOL	MOTILIDADE
<i>Proteus vulgaris</i>	Pos	Pos	Pos
<i>Shigella sonnei</i>	Neg	Neg	Neg
<i>Escherichia coli</i>	Neg	Pos	Pos

- *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Shigella sonnei* ATCC 25931, *Escherichia coli* ATCC 25922.

C) Meio MIO:

MICROORGANISMO	MOTILIDADE	INDOL	ORNITINA
<i>Escherichia coli</i>	Pos	Pos	Pos
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Pos	Neg	Pos
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Neg	Pos	Neg

- *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883.

D) Meio MILI:

MICROORGANISMO	CRESCIMENTO	LISINA	MOTILIDADE	INDOL
<i>Escherichia coli</i>	Denso	Pos	Pos	Neg
<i>K. pneumoniae</i>	Denso	Pos	Neg	Neg
<i>P. alcalifaciens</i>	Denso	Neg	Pos	Neg
<i>S. enteritidis</i>	Denso	Pos	Pos	Neg
<i>S. flexneri</i>	Denso	Neg	Neg	Neg

- *E. coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Providencia alcalifaciens* ATCC 9886, *Salmonella enteritidis*.
- ATCC 13076, *Shigella flexneri* ATCC 12022.

E) Meio BHI/Caldo Triptona:

- Positivo: *Escherichia coli* ATCC 25922.
- Negativo: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- Negativo: meio sem inocular.

4.9.6 Inoculação

A) Meio Motilidade/Meio SIM/Meio MILI/Meio MIO

- Com o auxílio de um fio bacteriológico inocular uma colônia pura de 18 – 24 horas, no meio na posição vertical, lentamente até a base.
- Afastar a agulha seguindo a linha inicial da incubação.
- Incubar a 35°C por 18-24 horas.

B) Meio Caldo BHI/Meio Caldo Triptona

- Com o auxílio de uma alça ou fio bacteriológico, inocular colônia pura de 18 a 24 horas.
- Incubar a 35±2°C por 24 a 48 horas.

4.9.7 Interpretação

A) Meio de Motilidade:

- Motilidade positiva: organismos móveis migram pela linha do inóculo e difundem-se no meio, causando turbidez.
- Motilidade negativa: bactéria tem um crescimento acentuado ao longo da linha de inóculo, em volta continua límpido.

B) Meio de Motilidade com Tetrazólio:

- Motilidade positiva: organismos móveis produzem uma nuvem cor pink e difundem-se completamente no meio.

- Motilidade negativa: há crescimento da bactéria e produção de cor vermelho claro na linha do inóculo e em volta do meio continua límpido.
- Se resultado for negativo incubar a 21-25°C por até 5 dias.

C) Revelação com reativo de Kovacs no meio SIM:

- Realizar a leitura da motilidade e do H₂S.
- Em seguida adicionar 5 gotas do reativo de Kovacs pela parede do tubo no meio contendo o crescimento bacteriano. **Agitar o tubo suavemente** e proceder a leitura do indol.
 - Motilidade positiva: micro-organismos móveis migram pela linha do inóculo e difundem-se no meio causando turbidez.
 - Motilidade negativa: bactéria tem um crescimento acentuado ao longo da linha do inóculo, em volta continua límpido.
 - H₂S positivo: ao longo da linha de inoculação aparecerá a cor negra.
 - H₂S negativo: linha ao longo da inoculação inalterada.
 - Indol positivo aparecerá um anel vermelho.
 - Indol negativo permanecerá um anel amarelo (cor original do reativo de Kovacs).

D) Meio MILI:

- Interpretar as reações da motilidade e lisina antes da adição do reagente de Kovacs para detecção do indol.
 - Motilidade positiva: indicado pelo crescimento na linha e em volta do inóculo.
 - Motilidade negativa: crescimento somente na linha do inóculo.
 - Lisina decarboxilase positiva: indicado pela cor púrpura no meio (essa cor pode variar de intensa ou mais leve, de acordo com a redução do indicador).
 - Lisina decarboxilase negativa: indicado pela cor amarela do meio.
 - Indol positivo: indicado pela formação de cor pink/vermelho, após a adição de 3 a 4 gotas de reagente de Kovacs na superfície do meio e agitação suave no tubo.
 - Indol negativo: reação negativa é indicada pelo desenvolvimento de cor amarela.

E) Meio MIO:

- Interpretar as reações da motilidade e ornitina antes da adição do reagente de Kovacs para detecção do indol.
 - Motilidade positiva: indicado pelo crescimento na linha e em volta do inóculo.
 - Motilidade negativa: crescimento somente na linha do inóculo.
 - Ornitina decarboxilase positiva: indicado pela cor púrpura no meio.

- Ornitina decarboxilase negativa: indicado pela cor amarela no meio.
- Indol positivo: indicado pela formação de cor pink/vermelho, após a adição de 3 a 4 gotas de reagente de Kovacs na superfície do meio e agitação suave no tubo.
- Indol negativo: reação negativa é indicada pelo aparecimento da cor amarela.

F) Meio caldo BHI/Meio Caldo Triptona:

- Colocar uma gota do meio entre lâmina e lamínula e observar ao microscópio com objetiva de 40 X. A motilidade verdadeira deve ser diferenciada do movimento “browniano”, verificando que o micro-organismo se desloca em várias direções.
- Motilidade positiva: bactérias se movendo de um lado para outro.
- Motilidade negativa: bactéria apresenta somente movimento “browniano”.

4.9.8 Conservação e validade

- Meios motilidade, SIM, MILI, MIO e BHI: conservar de 4 a 8° C por até 3 meses.

4.9.9 Recomendações

- A temperatura de incubação é extremamente crítica, porque muitos micro-organismos são móveis a 15-25°C e não móveis a 37°C. Se houver suspeita que o micro-organismo pode exibir motilidade em baixa temperatura, inocular dois tubos simultaneamente, incubando um a 35°C e outro a temperatura ambiente 22-25°C.
- Uso do sal de tetrazólio no meio de motilidade é desejável, mas pode inibir certos micro-organismos fastidiosos.
- Flagelo é o órgão locomotor e é composto de proteína, essa proteína pode se desnaturar com excesso de calor. Por isso cultura testada em temperaturas acima do indicado para o teste de motilidade pode fornecer um resultado falso negativo.
- Flagelo pode ser destruído também sob agitação violenta do tubo de cultura da bactéria, podendo produzir um resultado de motilidade fraco positivo ou falso negativo.
- Micro-organismos mantidos em estoques de cultura em meios artificiais por longos períodos tendem a perder sua motilidade.
- Os testes de motilidade em anaeróbios são difíceis de serem interpretados, sendo significativos apenas os resultados positivos.

4.10 Prova de tolerância ao NaCl 6,5%

4.10.1 Princípio

- A tolerância ao NaCl a 6,5% é uma prova utilizada para verificar a capacidade de alguns micro-organismos crescerem em presença do sal.
- Meio base utilizado é o BHI caldo, que é um meio nutritivo de uso geral, empregado para o cultivo de muitas bactérias. Esse meio normalmente contém 0,5 % de NaCl e aumenta-se a concentração para 6,5 %, tornando um meio semi-seletivo para o desenvolvimento de alguns micro-organismos.

4.10.2 Utilidade

- Separa *Enterococcus* spp., que são NaCl 6,5 % positivo dos demais *Streptococcus* spp., que são NaCl 6,5% negativos.
- Na identificação de bacilos Gram-negativos não fermentadores.

4.10.3 Fórmula/Produto

- Não há meio pronto para uso.
- **Fórmula:**
 - BHI caldo 25 g
 - NaCl 60 g
 - Indicador * 1 mL
 - Glicose 1 g
 - Água destilada 1000 mL
 - * Indicador púrpura de bromocresol:
 - Púrpura de bromocresol 1,6 g
 - Etanol a 95% 100 mL
 - Observação: o uso de indicador é opcional.

4.10.4 Procedimentos

- Pesar o BHI, o NaCl e a glicose em um béquer.
- Adicionar a água e homogeneizar bem até completa dissolução.
- Adicionar o indicador e homogeneizar novamente.
- Distribuir 3 mL por tubo.
- Esterilizar em autoclave.

4.10.5 Controle de qualidade

- Positivo: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ou *Enterococcus faecium*.
- Negativo: *Streptococcus do grupo viridans* ou *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305.

4.10.6 Conservação e validade

- Conservar embalado de 4 a 8°C por até 3 meses.

4.10.7 Inoculação

- Dissolver as colônias no caldo.
- Incubar.

4.10.8 Interpretação

- Cor original do meio: amarelo ou púrpura (dependendo do uso do indicador na composição).
- Positivo: Crescimento bacteriano (turvação do meio) com ou sem viragem do indicador.
- Negativo: Ausência de crescimento. O meio permanece com a cor original, púrpura e sem turvação.

4.10.9 Recomendações

- Provas negativas com 24 horas de incubação, recomenda-se período de incubação maior (48 horas).
- Verificar a quantidade de NaCl contido na fórmula do meio de BHI, pois a concentração poderá ser outra, dependendo do fabricante do meio, e a concentração final do meio de NaCl a 6,5 % poderá ser superior ou inferior à concentração desejada.
- Não carregar no inóculo, pois o excesso poderá ser interpretado como crescimento e dar resultados falso – positivos (para os meios utilizados sem o indicador).
- Antes da leitura, agitar delicadamente o tubo, pois pode haver sedimentação das células bacterianas formadas; Os *Streptococcus beta hemolítico presumível do grupo B de Lancefield (S. agalactiae)* e ocasionalmente os *Streptococcus beta hemolítico presumível do grupo A de Lancefield (S. pyogenes)* podem ser tolerantes ao NaCl 6,5%. Utilizar outras provas para confirmar a identificação destas espécies.

Capítulo 5: Discos para Identificação

Rosângela Aparecida Mendes Silva
Maria Carmen Gonçalves Lopes
Julia Taeko Utiyama Yoshida

5.1 Bacitracina

5.1.1 Princípio

- *Streptococcus* beta hemolítico do grupo A são sensíveis a concentrações baixas de bacitracina.

5.1.2 Utilidade

- Identificação presuntiva de *Streptococcus* beta hemolítico do grupo A (*S. pyogenes*).

5.1.3 Produto

- Discos de bacitracina de 0,04 unidades/disco.

5.1.4 Controle de qualidade

- Positivo (Sensível): *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.
- Negativo (Resistente): *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813.

5.1.5 Conservação e validade

- Manter à 4°C.
- Validade: ver recomendações do fabricante.

5.1.6 Inoculação

- A partir de caldo BHI ou TSB recém-turvado, semear na superfície do meio Mueller hinton sangue, com auxílio do *swab*.
- Colocar um disco de bacitracina e pressionar levemente.
- Incubar à 35°C 18 a 24 horas.

5.1.7 Interpretação

- Positivo (Sensível): Presença de qualquer halo ao redor do disco.
- Negativo (Resistente): ausência de halo ao redor do disco.

5.1.8 Recomendações

- *Streptococcus* alfa hemolíticos são sensíveis a baixas concentrações de bacitracina.
- Não existem dados disponíveis que indiquem a necessidade de medir os halos de inibição.
- O inóculo bacteriano deve ser confluyente, inóculo muito diluído pode permitir que os *Streptococcus* não pertencentes ao grupo A pareçam sensíveis à bacitracina.

5.2 Novobiocina

5.2.9 Princípio

- Separa espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa que podem ser sensíveis ou não a Novobiocina.

5.2.10 Utilidade

- Separa cepas de *Staphylococcus saprophyticus* (Novobiocina resistente) das demais cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa de importância clínica.

5.2.11 Fórmula/Produto

- Discos de Novobiocina de 5 µg.

5.2.12 Controle de qualidade

- Positivo: *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305.
- Negativo: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

5.2.13 Conservação e validade

- Refrigerado.
- Validade: ver recomendações do fabricante.

5.2.14 Inoculação

- Preparar uma suspensão do micro-organismo em estudo com crescimento recente (até 24 horas) em caldo BHI, TSA ou solução fisiológica estéril, acertando a turvação na escala 0,5 de MacFarland.
- Com auxílio de um *swab*, semear na superfície de uma placa de Ágar Mueller Hinton.

- Com uma pinça previamente flambada, colocar um disco de Novobiocina na superfície do meio e pressionar delicadamente.
- Incubar.

5.2.15 Interpretação

- Resistente: Ausência de halo de inibição ou halos ≤ 15 mm.
- Sensível: Presença de halo de inibição igual ou superior a 16 mm.

5.2.16 Recomendações

- Não usar cepas velhas (com crescimento superior a 24 horas) para fazer a suspensão.
- Se necessário usar cepas velhas, semear em caldo BHI ou TSA e incubar à 37°C até turvar, acertar a turvação na escala 0,5 de MacFarland para fazer o teste.
- Cepas isoladas de outros materiais biológicos que não urina, fazer identificação complementar com fermentação de açúcares para confirmar espécie.

5.3 Optoquina

5.3.1 Princípio

- Cloridrato de etil-hidroxicupreína (optoquina), um derivado da quinina, inibe de forma seletiva o crescimento de *Streptococcus pneumoniae* em concentrações muito baixas (5 $\mu\text{g/mL}$ ou menores).
- As células do *Streptococcus pneumoniae* que rodeiam o disco sofrem lise, devido à variação da tensão superficial, e é produzida uma área de inibição.

5.3.2 Utilidade

- Separa *Streptococcus pneumoniae* dos demais *Streptococcus* alfa hemolíticos.

5.3.3 Fórmula/Produto

- Discos de optoquina de 5 μg

5.3.4 Controle de qualidade

- Positivo (Sensível): *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305.
- Negativo(Resistente): *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

5.3.5 Conservação e validade

- Manter à 4°C.

- Validade: ver recomendações do fabricante.

5.3.6 Inoculação

- A partir de caldo BHI ou TSB recém-turvado, semear na superfície do meio Mueller hinton sangue, com auxílio do *swab*.
- Colocar um disco de optoquina e pressionar levemente.
- Incubar à 35°C 18 a 24 horas em jarra com vela acesa ou estufa com 5 a 7 de CO₂.

5.3.7 Interpretação

Positivo (Sensível):

- Disco de 6 mm: halo de inibição de 14 mm ou mais.
- Disco de 10 mm: halo de inibição de 16 mm ou mais.

Negativo (Resistente):

- Disco de 6 mm: halo de inibição inferior à 14 mm ou ausência de halo.
- Disco de 10 mm: halo de inibição inferior à 16 mm ou ausência de halo.

5.3.8 Recomendações

- A optoquina pode inibir outros *Streptococcus do grupo viridans*, mas apenas em concentrações muito elevadas.

Referências Bibliográficas

BALOWS A., HAUSLER, W.J. Jr., HERRMANN, K.L., ISENBERG, H.D., SHADOMY, H.J. Manual of clinical microbiology. 5th Ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1991.

BD (Becton Dickinson and Company). Manual of BBL products and laboratory procedures. 6th Ed. United States of America, 1988.

BD (Becton Dickinson and Company). Product catalog for microbiology 1996/1997, Canada, 1997.

DIFCO manual. 10th Ed. Detroit, 1984.

KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., JANDA, W.M., SCRECKENBERGER, P.C., WINN, W.C. Diagnostic Microbiology. 6th ed., 2005.

LARONE, D.H. Medically Important Fungi: a guide to identification. 3rd. Ed., Washington: American Society for Microbiology, 1994.

MC FADDIN, J.F. Biochemical tests for identification of medical bacteria: Ed. William & Wilkins Co., Baltimore, 2000.

MERCK. Manual de medios de cultivo. Darmstadt, 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. 2^a. Ed., Rio de Janeiro, 1994.

MURRAY, P.R., BARON, J.E., PFALLER, A.M., TENOVER, C.F., YOLKEN, H.R. Manual of Clinical Microbiology: American Society for Microbiology, 8th Ed., Washington. D.C., 2003.

OPLUSTIL, C.P., ZOCCOLI, C.M., TOBOUTI, N.R., SINTO, S.I. Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica: Sarvier, São Paulo, 2000.

MANUAL Oxoid. 8^a. Edição em inglês. 1^a Ed. em português. 2000.





**Acesse o site
da ANVISA**

Baixe o leitor de QR
Code em seu celular e
fotografe este código

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa
SIA Trecho 5 - Área especial 57 - Lote 200
CEP: 71205-050
Brasília - DF
Telefone: 61 3462 6000

www.anvisa.gov.br
www.twitter.com/anvisa_oficial
Anvisa Atende: 0800-642-9782
ouvidoria@anvisa.gov.br