



IPG Politécnico
|da|Guarda
Polytechnic
of Guarda

RELATÓRIO DE ESTÁGIO PROFISSIONAL II

Licenciatura em Farmácia

Vera Lúcia Almeida Martins

julho | 2013





Escola Superior de Saúde
Instituto Politécnico da Guarda

RELATÓRIO DE ESTÁGIO
PROFISSIONAL II

VERA LÚCIA ALMEIDA MARTINS

RELATÓRIO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE LICENCIADO EM FARMÁCIA

julho/2013



Escola Superior de Saúde
Instituto Politécnico da Guarda

RELATÓRIO DE ESTÁGIO PROFISSIONAL II

VERA LÚCIA ALMEIDA MARTINS

CURSO FARMÁCIA - 1º CICLO

4º ANO / 2º SEMESTRE

LOCAL DE ESTÁGIO:
LABORATÓRIO DE SAÚDE PÚBLICA, ULS GUARDA

SUPERVISOR:
PAULA LOURENÇO

ORIENTADOR:
ANDRÉ RICARDO TOMÁS DOS SANTOS ARAÚJO PEREIRA

julho/2013

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer a todos aqueles que contribuíram para a realização deste estágio.

Agradeço à Dr.^a Paula Lourenço por se mostrar disponível para a realização do mesmo.

A todas as técnicas e auxiliares agradeço os conhecimentos extra adquiridos que vão complementar a minha formação enquanto técnica de saúde e cidadã.

Aos professores André Pereira e Sandra Ventura, um muito obrigada especial pela disponibilidade demonstrada ao longo deste estágio e por contribuírem de forma decisiva para a melhor realização do mesmo.

SIGLAS E ABREVIATURAS

CQA – Controlo de Qualidade Analítica

Dr.^a. – Doutora

E. coli - *Escherichia coli*

ISO – *International Organization for Standardization*

LSA – Lauril sulfato Agar

MSA – Manitol Salt Agar

OMS – Organização Mundial de Saúde

P. aeruginosa – *Pseudomonas aeruginosa*

S – Desvio padrão

SB – Slanetz & Bartley

TSA – Triptose Sulfito Agar

TSC – Triptose Sulfito Cicloserina

TTC – Cloreto de tetrazolium

UE – União Europeia

UFC – Unidades Formadoras de Colónias

ULS – Unidade Local de Saúde

UV – Ultravioleta

WPCA – Water Plate Count Agar

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1 - Frascos de pescoço de cisne	11
Ilustração 2 - Característica organolética da água: cor	13
Ilustração 3 - Placas de Petri.....	25
Ilustração 4 - Lentículas NCTC da HPA	25
Ilustração 5 - Passos a seguir na colheita de uma amostra de água de abastecimento	37
Ilustração 6 - Técnica da membrana filtrante	41
Ilustração 7 - Jarra de anaerobiose	42
Ilustração 8 - Método de estrias.....	42
Ilustração 9 - método de espalhamento e método de incorporação	43
Ilustração 10 - Microrganismos cultiváveis a 37°C e a 22°C em meio de WPCA	48
Ilustração 11 - <i>Clostridium perfringens</i> em meio de TSC.....	49
Ilustração 12 - Colónias suspeitas de <i>E.coli</i> em meio de LSA	53
Ilustração 13 - Colónias suspeitas de <i>estafilococos</i> em meio de MSA	55
Ilustração 14 - Coloração de Gram.....	56

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das águas	46
Tabela 2 - Confirmação de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	60

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Sementeira de amostras de águas de Abastecimento.....	38
Esquema 2 - Sementeira de amostras de águas termais.....	39
Esquema 3 - Sementeira de amostras de águas para fins recreativos - piscinas.....	40

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	8
1. MICROBIOLOGIA	10
2. QUALIDADE DA ÁGUA	13
3. ATIVIDADES PLANEADAS	17
4. DESCRIÇÃO DO LABORATÓRIO DE SAÚDE PÚBLICA, ULS GUARDA	18
5. CONTROLO DE QUALIDADE INTERNA DO LABORATÓRIO DE SAÚDE PÚBLICA	20
5.1. CONTROLO DE QUALIDADE ANALÍTICA	21
5.1.1. Ensaios em Branco.....	21
5.1.2. Controlo de testes de confirmação	21
5.1.3. Análise de amostras em duplicado	22
5.2. CONTROLO DE QUALIDADE DO MATERIAL E EQUIPAMENTOS	22
5.2.1. Instalações	22
5.2.2. Controlo de esterilidade do material adquirido.....	24
5.3. PROCEDIMENTO PARA A HIDRATAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS LENTÍCULAS DO MATERIAL DE REFERÊNCIA	25
5.4. MEIOS DE CULTURA	27
5.5. PROCEDIMENTO PARA A PREPARAÇÃO E ARMAZENAMENTO DE MEIOS DE CULTURA.....	35
5.6. COLHEITA E TRATAMENTO DE AMOSTRAS DE ÁGUAS	36
5.7. PROTOCOLO PARA A RECEÇÃO DE AMOSTRAS DE ÁGUAS	40
5.8. PROCEDIMENTO PARA A SEMENTEIRA DE ÁGUAS PELO MÉTODO DE MEMBRANA FILTRANTE.....	41
5.9. TÉCNICAS ESPECIAIS DE CULTURA DE MICRORGANISMOS	42
5.10. PROCEDIMENTO PARA A DESCONTAMINAÇÃO, LAVAGEM E ESTERILIZAÇÃO DO MATERIAL DE MICROBIOLOGIA	43
6. CONTROLO DE QUALIDADE EXTERNA	45
7. CLASSIFICAÇÃO DAS ÁGUAS	46
8. PESQUISA E QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS	47
8.1. PESQUISA E QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS CULTIVÁVEIS A 37°C E A 22°C.....	47

8.1. PESQUISA E QUANTIFICAÇÃO DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS.....	49
8.2. PESQUISA E QUANTIFICAÇÃO DE ESPOROS DE BACTÉRIAS ANAERÓBIAS SULFITO-REDUTORAS.....	51
8.3. PESQUISA E QUANTIFICAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS E E. COLI	52
8.4. PESQUISA E QUANTIFICAÇÃO DE ESTAFILOCOCOS.....	55
8.5. PESQUISA E QUANTIFICAÇÃO DE ENTEROCOCCUS	58
8.6. PESQUISA E QUANTIFICAÇÃO DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA.....	59
CONCLUSÃO.....	61
BIBLIOGRAFIA	63

INTRODUÇÃO

Este relatório insere-se no âmbito da realização do Estágio de Integração à Vida Profissional, componente da Unidade Curricular de Estágio Profissional II, inserida no 2º semestre do 4º ano do plano de estudos do curso de Farmácia 1º Ciclo, da Escola Superior de Saúde, do Instituto Politécnico da Guarda ⁽¹⁾.

O Estágio Profissional II é uma unidade curricular de carácter obrigatório e objeto de avaliação, em que a aprendizagem se desenvolve em contexto real, sendo por isso encarado como um estágio de integração à vida profissional ⁽¹⁾.

A componente de Integração à Vida Profissional decorreu entre o dia 4 de março de 2013 e o dia 30 de abril de 2013, tendo uma carga horária de 250 horas, distribuídas de acordo com o horário ajustado à realidade do local de estágio.

Este estágio foi realizado no Laboratório de Saúde Pública, Unidade Local de Saúde (ULS) da Guarda. A coordenação esteve a cargo do docente André Ricardo Tomás dos Santos Araújo Pereira, com a colaboração das docentes Sandra Cristina do Espírito Santo Ventura e Maria de Fátima dos Santos Roque. A supervisão esteve a cargo da responsável pelo laboratório, a Dr.^a Paula Lourenço.

O estágio é uma importante vertente de formação, permitindo ao estudante uma aprendizagem no seio de uma família multidisciplinar de saúde ⁽¹⁾.

São objetivos gerais do estágio favorecer, em contexto real, a integração das aprendizagens que vão sendo desenvolvidas ao longo do curso, de modo a que o perfil do estudante vá ao encontro das competências necessárias no âmbito da sua formação e preparar o estudante para dar resposta às exigências da sociedade, promovendo a socialização e integração profissional ⁽¹⁾.

Outros objetivos deste estágio são: desenvolver competências científicas e técnicas que permitem ao estudante a realização de atividades subjacentes à profissão do Técnico de Farmácia, o enquadramento das várias áreas de intervenção profissional; aplicar os princípios éticos e deontológicos subjacentes à profissão; identificar, desenvolver e avaliar planos de intervenção adequadamente integrados numa equipa multidisciplinar e responder aos desafios profissionais com inovação, criatividade e flexibilidade ⁽¹⁾.

A realização do relatório de estágio é fundamental para a avaliação, sendo este de carácter explorativo, descritivo e informativo. Para a realização do mesmo recorreu-se a

várias informações de carácter teórico, teórico-prático e prático que foram adquiridos ao longo dos três anos de formação do curso de Licenciatura em Farmácia.

Este relatório possui uma descrição pormenorizada de todas as atividades realizadas durante este estágio ⁽¹⁾.

1. MICROBIOLOGIA

A Microbiologia é a ciência que estuda os seres vivos de dimensões microscópicas. O nome deriva de três palavras gregas: *mikros* – pequeno; *bios* – vida e *logos* – ciência. Esta é uma definição simples, contudo não é abrangente, pois a Virologia, que é considerada uma das áreas mais importantes da Microbiologia, estuda entidades biológicas, os vírus que não são definidos como seres vivos. Estes apresentam-se como matéria inerte fora das células onde, obrigatoriamente se replicam, afastando-se do conceito clássico da definição de ser vivo. A Parasitologia é outra área abrangida pela Microbiologia, no entanto, os seres vivos aqui estudados, aquando no seu estado adulto são visíveis a “olho nu”, podendo atingir grandes dimensões. O que determina, no entanto, a presença destes seres vivos na Microbiologia são as dimensões microscópicas dos seus ovos ou das suas formas larvares. A Microbiologia utiliza, no seu estudo, nas diversas áreas, técnicas e métodos muitas vezes semelhantes, que incluem o isolamento dos microrganismos, a sua cultura e identificação destes ⁽²⁾.

O nascimento da Microbiologia deu-se quando começou a ser possível a observação de seres de dimensões microscópicas. Antes de os microrganismos poderem ser vistos, já alguns investigadores suspeitavam da sua existência.

Antony Van Leeuwenhoek, um mercador de tecidos na Holanda, já usava lentes para observar os seus tecidos, e sendo um Microscopista amador, construiu ao longo da sua vida mais de 250 microscópios que utilizou para observar e descrever, pela primeira vez, microrganismos da água, saliva, fezes e de outros produtos a que chamou “animáculos”. A partir das suas observações desenhou bactérias e protozoários, entre outros microrganismos. Foram necessários cerca de 200 anos, para que as suas descobertas, com Pasteur fossem associadas a doenças ⁽²⁾.

Leeuwenhoek verificou ainda que havia aumento do número de bactérias encontradas quando deixava as suas infusões de matéria orgânica, animal ou vegetal, à temperatura ambiente, durante algumas semanas, acreditando que tal aumento provinha dos poucos microrganismos que existiam inicialmente e que funcionavam como verdadeiras “sementes”. Nesta época começam a surgir as teorias da **geração espontânea** ou **abiogénese** que admitia a formação espontânea de vida a partir da matéria morta ou em decomposição, dela nascendo seres minúsculos, sendo esta teoria já defendida por

Aristóteles e o conceito de **biogénese** que defendia que todos os seres, mesmo os mais pequenos, nasciam de outros iguais a si, seus pais ⁽²⁾.

Foi em 1861 que Pasteur veio demonstrar, com os seus frascos de pescoço de cisne (Ilustração 1), que não existia geração espontânea, mas que todos os microrganismos provinham de outros pré-existentes no ar. Pasteur demonstra que as poeiras de ar infetadas ficam retidas na curvatura inferior do tubo, mantendo-se os líquidos no frasco estéril.

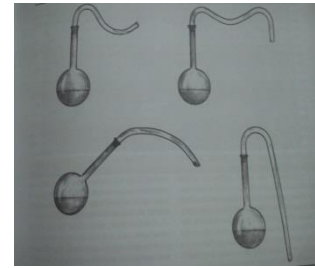


Ilustração 1 - Frascos de pescoço de cisne

Fonte: Canas, W. F., et all;
2000

Das observações feitas por Pasteur e outros, no seguimento de estudos realizados sobre o crescimento de microrganismos em infusões orgânicas, verificaram-se alterações químicas que foram designadas de fermentações e putrefações, a primeira originando a formação de álcool e ácidos orgânicos a partir de carboidratos e a segunda resultava da decomposição de proteínas, com formação de um cheiro nauseabundo. No decorrer destes estudos descobre-se a existência de outras formas de vida que não necessitam da presença de oxigénio do ar, vida em anaerobiose ⁽²⁾.

Outro passo importante deu-se quando se reconheceu que os microrganismos eram causadores de doenças no Homem e nos animais. Joseph Lister, cirurgião inglês, conhecia os trabalhos de Pasteur sobre a possível relação dos microrganismos com a putrefação da matéria orgânica, tentou prevenir as infeções das feridas operatórias ao utilizar a vaporização dos instrumentos, do ar e do próprio campo operatório. Estas medidas vieram reduzir drasticamente o número de infeções operatórias ⁽²⁾.

A primeira demonstração direta do papel de um determinado microrganismo no desenvolvimento de uma doença foi apresentada por Robert Koch em estudos publicados sobre o *Baccillus anthracis* e a doença que este agente produzia, o carbúnculo. Koch definiu um conjunto de princípios relacionados com os agentes que estudou, que se denominam postulados de Koch ⁽²⁾: um microrganismo específico deve sempre estar associado a cada caso de doença; o microrganismo suspeito deve ser isolado e deve ser capaz de crescer em cultura pura, em laboratório; a inoculação daquela cultura deve ser capaz de produzir a mesma doença num animal suscetível; o mesmo microrganismo deve ser isolado a partir do animal doente.

Sabe-se que estes postulados nem sempre podem ser cumpridos, uma vez que há microrganismos que não crescem em meios de cultura (vírus da hepatite C) e existem

microrganismos que não provocam doenças em animais de laboratório (vírus da hepatite C) ⁽²⁾.

Outro aspeto que se tornava quase impossível era a necessidade de se isolar o microrganismo suspeito em cultura pura, uma vez que o meio sólido até aí utilizado, a batata cozida cortada ao meio, não permitia o crescimento de certos microrganismos conhecidos e os meios líquidos não permitiam isolar agentes em cultura pura. O aparecimento dos meios sólidos surge pela adição da gelatina, por Koch, como solidificante dos meios líquidos. Um colaborador deste, Richard Petri desenvolveu a placa de Petri, uma importante peça para o suporte dos meios sólidos produzidos ⁽²⁾.

Outras marcas relevantes na história da Microbiologia são: a descoberta dos vírus, entidades microbiológicas que são capazes de atravessar os filtros bacterianos; o desenvolvimento das primeiras vacinas; a descoberta do papel de certos leucócitos sobre a destruição de bactérias, designando-se essas células por fagócitos e ao processo de fagocitose; a descoberta, por Alexander Fleming, da penicilina (primeiro antibiótico a ser descoberto); o desenvolvimento do primeiro microscópio eletrónico que veio a revelar-se uma grande ajuda na divisão dos seres vivos em dois grupos consoante a sua organização celular: eucariotas e procariotas, entre outros.

Câmara Pestana é considerado o fundador da Bacteriologia no nosso País, exercendo atividades de investigador e pedagogo. Em 1899 surge no Porto uma epidemia de peste bubónica. Vários investigadores vieram à cidade para tentar ajudar no combate à doença, incluindo Câmara Pestana, que acaba por falecer vítima desta doença ⁽²⁾.

2. QUALIDADE DA ÁGUA

A água é “um dom divino da natureza”, pois foi nas águas do oceano primordial que, muito provavelmente se formaram e desenvolveram as primeiras formas de vida ⁽³⁾.

Por isso, a água constitui um elemento indispensável à vida, não só na cobertura das necessidades hídricas de cada indivíduo, mas também porque é bastante utilizada em muitas outras atividades que são igualmente indispensáveis a uma melhor qualidade de vida do Homem tais como: preparação e cozedura de alimentos, lavagem e evacuação de matérias fecais, entre outras atividades, constituindo um fator essencial do saneamento básico, da higiene pública e individual e da sua melhoria ⁽²⁾.

O Homem é um consumidor de água de forma quase absoluta, tendo a necessidade de ingerir entre um litro e meio a dois litros de água na sua dieta alimentar ^(2,3). No entanto, os valores de consumo de água podem atingir os 100 a 200 litros por habitante e por dia, de acordo com o seu modo de vida ⁽²⁾.

A noção de qualidade da água tem que ser definida, com o maior rigor possível. No entanto, este é um conceito relativo, uma vez que é caracterizado em função do seu utilizador e/ou fim a que se destina. Assim, podemos dizer que uma água não é boa para todos os fins pois, por exemplo, a água destilada, quase pura, não serve para beber, o seu consumo conduziria à morte pela perda de minerais que seriam retirados do organismo por essa água, que é fortemente ácida, e uma água para consumo humano pode não ser adequada para outros fins, como a indústria do papel – a água para consumo contém determinada quantidade de ferro, enquanto elemento essencial à vida, que iria tornar o papel inutilizável devido às manchas de ferrugem ⁽³⁾. Por esta perspetiva pode afirmar-se que não existe nenhuma água que tenha uma boa qualidade em valor absoluto. Uma água serve para determinados fins e é para esses, e só para esses fins que tem qualidade para ser utilizada ^(2,3).



Ilustração 2 - Característica organoléptica da água: cor

Fonte:

<http://www.prolabnet.com.br/servicos.php?k=&s=129>

A água é avaliada, numa primeira impressão, pelas características organolépticas (Ilustração 2), ou seja, pela sua cor, turbidez, cheiro e sabor. Assim, uma água, num conceito empírico, não deverá apresentar nenhum dos parâmetros referidos ⁽³⁾. No entanto, uma coloração anormal, embora seja desagradável, pode não ter significado sanitário e uma água

incolor pode não ter boa qualidade, caso alguns parâmetros químicos e microbiológicos não sejam respeitados; também, uma água pode ser turva sem que daí resultem riscos para a saúde, embora este seja um indicador de que a qualidade da água é duvidosa ou que alguma coisa correu mal ao nível do tratamento desta; o sabor da água pode não constituir um indicador da qualidade intrínseca desta, pois algumas substâncias minerais podem originar sabores a níveis mais reduzidos do que aqueles aos quais são imputáveis efeitos tóxicos. Por outro lado uma água pode apresentar um sabor agradável sem que apresente as características que permitam o seu consumo, no entanto, a existência de um sabor desagradável ou um sabor que não é habitual pode ser indicador de alteração da qualidade da água. Em relação ao cheiro, qualquer aroma presente na água é prenúncio de um processo de degradação da sua qualidade ⁽³⁾.

No entanto, uma água, para ser adequada ao consumo, para além destes critérios, deverá respeitar muitas outras exigências que não são passíveis de avaliação sensorial – é o caso dos parâmetros microbiológicos.

Na avaliação da qualidade da água recorre-se a um grande número de técnicas analíticas, físicas, químicas e microbiológicas, cujo número e complexidade têm vindo a aumentar ao longo dos anos ^(2,3).

A água encontra-se contaminada por numerosos e diversos microrganismos. Muitos destes não representam risco para a saúde humana, no entanto, há outros que podem ser causadores ou transmissores de doenças ⁽³⁾.

Como a contaminação da água é muito corrente, existe a necessidade da prevenção de riscos, para que se possa distribuir água de boa qualidade. Tal objetivo é alcançado ao aplicar medidas preventivas e tratamentos adequados para eliminar a presença de microrganismos, quer para evitar a introdução destes na rede de abastecimento.

A análise microbiológica tem por objetivo a deteção de microrganismos patogénicos, sendo os de maior risco os que resultam da contaminação direta ou indireta pelos excrementos dos animais de sangue quente, incluindo o Homem ⁽³⁾.

A população microbiológica de uma água é muito variável, o número e diversidade dos microrganismos, quer sejam patogénicos ou não, variam com os fatores ambientais e, eles próprios, são suscetíveis de alterar o meio ambiente.

A grande maioria dos microrganismos patogénicos presentes na água é de origem fecal, humana ou não. A presença destes torna a água imprópria para consumo e, no caso

de uma água tratada, permite concluir que o tratamento não foi suficiente ou não foi corretamente efetuado ⁽³⁾.

Sendo que uma grande variedade de doenças ocorre devido à presença de microrganismos veiculados pelas águas ou alimentos contaminados com matérias fecais, é importante fazer o seu estudo e a sua pesquisa. Assim, são utilizados microrganismos indicadores de qualidade da água, como um índice da possível contaminação da água com microrganismos patogénicos humanos ⁽²⁾.

Não existe um microrganismo indicador ideal. A seleção de um microrganismo como indicador de qualidade da água deve obedecer aos seguintes critérios ^(2,3): deve ser apropriado para permitir a análise de todos os tipos de água; deve estar presente sempre que existam organismos patogénicos; deve existir em número superior aos organismos patogénicos presentes; deve ser mais resistente a eventuais desinfecções do que os organismos patogénicos presentes; não deverá reproduzir-se no meio aquático, após eventuais desinfecções; deverá ter uma distribuição aleatória numa massa de água; não deverá ter o seu crescimento inibido pelo crescimento de outros organismos; não deverá ser patogénico para o Homem; a sua pesquisa e identificação deverão ser possíveis, recorrendo a técnicas laboratoriais de fácil execução, rápidas e inequívocas; as técnicas laboratoriais de identificação deverão ter uma grande especificidade e sensibilidade e ser passíveis de detetar baixos níveis do indicador e a sua concentração em águas contaminadas deverá ter alguma relação direta com o nível de poluição de origem fecal.

Os indicadores mais corretamente utilizados como indicadores de poluição de origem fecal e designados de indicadores clássicos são ^(2,3):

➤ Grupo de microrganismos **coliformes totais e fecais**, membros da família *Enterobacteriaceae*: estas bactérias são comuns no trato intestinal do Homem e de outros animais, representando cerca de 10% dos microrganismos aí presentes. Este grupo é constituído por microrganismos Gram negativos, em forma de bastonetes, não esporulados, anaeróbios facultativos, oxidase negativos, crescem em condições aeróbias em meios de cultura seletivo contendo sais biliares, capazes de fermentar a lactose em 48 horas a 37°C com produção de ácido e gás. A *Escherichia coli* (*E. coli*) está presente neste grupo.

➤ Grupo dos *Enterococos fecais* geralmente reconhecido como indicador da contaminação fecal. A maior parte dos microrganismos anteriormente designados por *Streptococos fecais*, foram transferidos para o género *Enterococos*. Estes organismos são caracterizados pela sua capacidade de crescimento a 45°C na presença de 40% de sais

biliares e em concentrações elevadas de cloreto de sódio, que são inibidores dos microrganismos coliformes e para a grande maioria das bactérias. Neste grupo inclui-se o *Enterococcus faecalis*.

➤ O grupo de microrganismos designados por Clostrídios anaeróbios, esporulados, redutores de sulfito, possui um microrganismo de grande interesse como indicador de poluição de origem fecal – *Clostridium perfringens*. Este é uma bactéria Gram positiva, tem a forma de bastonete, forma esporos e é anaeróbia. O mesmo é bastante resistente à depuração natural e ao cloro, representa cerca de 95% dos microrganismos anaeróbios redutores de sulfito presentes nas fezes e nas águas residuais, estando em menor número do que os *Coliformes* e os *Enterococos* fecais. São indicadores de poluição hídrica de origem fecal, remota ou intermitente, devido aos longos períodos de permanência e às condições de sobrevivência dos seus esporos.

Recentemente, bactérias oportunistas Gram negativos, particularmente as *Pseudomonas aeruginosa*, patogénica para o Homem, com elevada resistência aos antibióticos, surgindo nas águas de recreio e nos equipamentos hospitalares, tem sido considerada como indicador de poluição fecal^(2,3).

Grande parte dos laboratórios e instituições considera que os *Coliformes* (totais e fecais) e os *Enterococos fecais* não preenchem todos os requisitos necessários à definição de organismos indicadores de poluição, tornando-se necessário a pesquisa de outros microrganismos designados por novos indicadores, que em conjunto com os indicadores clássicos, possam fornecer indicações mais seguras da poluição hídrica e da qualidade da água^(2,3).

Importa, ainda, referir que estão especificados os métodos de referência para o tratamento das amostras de águas, utilizando o método de membranas filtrantes e também está referenciado a frequência das colheitas, de modo a minimizar os riscos para a saúde, com o menor custo possível⁽³⁾.

3. ATIVIDADES PLANEADAS

Na realização deste estágio foram efetuadas as seguintes atividades:

- Participar no Controlo de Qualidade Interno do Laboratório de saúde Pública, fazendo referência ao:
 - ✓ Controlo de qualidade analítica (ensaios em branco, uso de amostras artificialmente contaminadas, entre outros);
 - ✓ Material e equipamentos;
 - ✓ Procedimento interno para a hidratação e avaliação das lenticulas do material de referência;
 - ✓ Meios de cultura (comercializados e desidratados);
 - ✓ Procedimento para a preparação e armazenamento dos meios de cultura;
 - ✓ Protocolo para a receção de amostras;
 - ✓ Procedimento interno para a sementeira de amostras pelo método de membrana filtrante;
 - ✓ Técnicas especiais de cultura de microrganismos;
 - ✓ Procedimento para a descontaminação, lavagem e esterilização do material de Microbiologia.
- Participar no controlo de qualidade externa do Laboratório de Saúde Pública.
- Classificação dos tipos de águas, microrganismos pesquisados e valores paramétricos
- Participar na pesquisa e quantificação de microrganismos como:
 - ✓ Microrganismos cultiváveis (*mesófilos*);
 - ✓ *Clostridium perfringens*;
 - ✓ Esporos de bactérias anaeróbias sulfito-redutoras;
 - ✓ Coliformes totais e *E.coli*;
 - ✓ Estafilococos;
 - ✓ *Enterococcus*;
 - ✓ *Pseudomonas aeruginosa*.

4. DESCRIÇÃO DO LABORATÓRIO DE SAÚDE PÚBLICA, ULS GUARDA

O Laboratório de Saúde Pública, ULS da Guarda situa-se no 3º piso do edifício central da ULS da Guarda.

Este é o primeiro laboratório na região Centro a obter a acreditação atribuída pelo Instituto Português de Acreditação. Esta distinção trás um reconhecimento da qualidade e competência técnica dos serviços prestados pelo Laboratório. Esta acreditação assegura que os resultados obtidos são confiáveis e credíveis, o que vai garantir uma maior confiança por parte dos clientes nos serviços prestados.

Este encontra-se dividido em 4 secções: microbiologia das águas; microbiologia dos alimentos/cantinas; química das águas e alimentos e a sala de desinfeção/lavagem do material.

O laboratório de Microbiologia deve ter superfícies lisas e fáceis de limpar, as bancadas de trabalho devem ser resistentes ao calor e às substâncias químicas e livres de ranhuras ou juntas expostas, onde os microrganismos se podem hospedar e desenvolver. As bancadas devem estar devidamente equipadas com gás, instalações de vácuo, entre outros. As bancadas de trabalho não devem ser usadas para armazenar equipamentos de laboratório ou meios de cultura, no entanto, o espaço situado por baixo pode ser usado para acomodar armários e gavetas para a arrumação de material. As bancadas laterais devem ser utilizadas para a colocação de material de laboratório, no entanto, os equipamentos delicados – balança de precisão – devem estar separados do material que produz vibração – banhos de água com agitação ⁽⁴⁾.

Assim, a microbiologia das águas possui uma bancada central onde se realizam os testes. Esta possui 4 rampas de filtração com 3 pontos cada, 2 bombas de sucção e 4 bicos de Bünsen junto das rampas de filtração. Por baixo desta bancada e à volta do laboratório, existem vários móveis que facilitam a arrumação do material como: campânulas de anaerobiose, ansas, pipetas de Pasteur esterilizadas, copos esterilizados de 100 mL e de 250 mL, membranas de 0,45 µm e de 0,22 µm, kit para coloração de Gram, geradores de anaerobiose, papel para pesagem e espátulas, tubos de ensaio, placas de Petri, tabuleiros, flamejador e recargas, suportes para tubos de ensaio, pipetas volumétricas e micropipetas, pontas para micropipetas, entre outro material necessário à realização das várias atividades. Nesta sala ainda se encontram duas estufas, uma a 37°C ± 1°C e outra a 22°C ± 2°C, duas

balanças de precisão, dois frigoríficos a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, uma câmara de fluxo laminar, um banho de água com agitação, um detetor de luz ultravioleta (UV), um vórtex, um contentor para lixo classe 4 (objetos cortantes contaminados) e um lixo branco (Classe 3 – objetos contaminados).

A temperatura desta sala encontra-se controlada e situa-se nos valores de $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

A sala de desinfeção/lavagem do material possui duas autoclaves, duas estufas (uma de secagem do material e outra de esterilização), um lavatório e bancadas para arrumação de algum material utilizado (balões de Erlenmeyer, balões volumétricos, entre outros).

Em relação aos recursos humanos do Laboratório de Saúde Pública, este é composto pela responsável pelo laboratório, três técnicas de Diagnóstico e Terapêutica na área de Análises Clínicas e de Saúde Pública e ainda por duas Assistentes Operacionais.

5. CONTROLO DE QUALIDADE INTERNA DO LABORATÓRIO DE SAÚDE PÚBLICA

Todos os dias muitos laboratórios realizam milhares de análises microbiológicas de alimentos e de águas. Os laboratórios públicos vigiam a qualidade de produtos alimentares, da água de abastecimento, de águas balneares para fins recreativos e de termas de forma a assegurar que são cumpridos as normas e orientações nacionais e internacionais. Estas normas são principalmente definidas pela União Europeia (UE) e pela Organização Mundial de Saúde (OMS).

Estas normas definem os critérios para a ocorrência de bactérias patogénicas ou potencialmente patogénicas nas águas, mas mais frequentemente dos chamados organismos indicadores ou da contagem total de bactérias não patogénicas de ocorrência natural ⁽⁴⁾.

O número elevado de análises efetuadas evidencia a importância da garantia da qualidade dos laboratórios que realizam estes ensaios. Resultados incorretos podem ter um forte impacto na economia e na saúde pública, resultados falso-positivos podem levar a medidas desnecessárias tais como encerramento dos locais de recreio e à divulgação de avisos como a fervura da água da rede de abastecimentos, que pode tornar-se numa medida muito dispendiosa. Os falso-negativos podem expor a população a riscos diretos para a saúde pública devido ao consumo de águas inadequadamente tratadas ou nadar em águas poluídas ⁽⁴⁾.

A **Garantia de Qualidade** é definida pela *International Organization for Standardization* (ISO) como “todas as ações planeadas e sistemáticas necessárias para proporcionar a confiança adequada de que um produto, processo ou serviço, irá satisfazer determinados requisitos de qualidade”. Isto inclui o **Controlo de Qualidade** – “técnicas e atividades operacionais que são usadas para cumprir os requisitos de qualidade”. As técnicas operacionais aplicadas ao método analítico são chamadas Controlo de Qualidade Analítico (CQA) que inclui, entre outros, o uso de controlos negativos - ensaios em branco; controlos positivos – uso de amostras artificialmente contaminadas e matérias de referência de níveis de contaminação conhecida ⁽⁴⁾.

Dentro do Controlo de Qualidade deve ter-se em conta: o uso de ensaios em branco, o uso de amostras artificialmente contaminadas, uso de materiais de referência, o controlo do ar e ambiente, a utilização de material esterilizado, entre outros.

5.1. CONTROLO DE QUALIDADE ANALÍTICA

O Controlo de Qualidade Analítica é definido como sendo o conjunto das técnicas e atividades operacionais usadas para preencher os requisitos de qualidade ⁽⁴⁾ e vai abranger todos os procedimentos que são efetuados pelo laboratório para que se possa realizar a avaliação contínua do trabalho realizado. Tem como principal objetivo assegurar a consistência dos resultados obtidos e assegurar a sua conformidade com os critérios definidos ⁽⁵⁾.

Dentro deste temos: ensaios em branco, uso de amostras artificialmente contaminadas, uso de materiais de referência com construção de cartas guia, análise de amostras cegas (ensaios interlaboratoriais) e análise de amostras em duplicado.

5.1.1. Ensaio em Branco

Os ensaios em branco têm como principal finalidade avaliar as condições de esterilidade durante todo o processo analítico no que se refere à esterilidade do meio, do diluente (quando aplicável) e a eficácia do operador. Este deve ser realizado diariamente para cada tipo de parâmetro analisado ⁽⁵⁾.

Este ensaio é constituído por uma amostra feita a partir de água desionizada estéril ou de um diluente estéril sobre a qual se realizam as filtrações, diluições, inoculações e incubações como se se tratasse de uma amostra normal.

Os resultados das leituras aqui obtidas deverão ser negativos, ou seja, não devem apresentar qualquer crescimento bacteriano (< 1 Unidades Formadoras de Colónias (UFC)). Quando ocorre um resultado positivo deve-se apurar a origem da contaminação e proceder às devidas ações corretivas ⁽⁵⁾.

5.1.2. Controlo de testes de confirmação

Os testes de confirmação que são feitos para as amostras são sempre acompanhados de um controlo positivo e um controlo negativo de acordo com os testes em causa.

Um exemplo de um controlo positivo/negativo nos testes de confirmação é: quando se suspeita que uma amostra possa ter *Pseudomonas aeruginosa*, aquando o teste de confirmação oxidase, utiliza-se para controlo negativo a estirpe *E. coli* e para controlo positivo a estirpe de referência *Pseudomonas aeruginosa* ⁽⁵⁾.

5.1.3. Análise de amostras em duplicado

Os ensaios em duplicado são feitos para assegurar a repetibilidade e a reprodutibilidade intralaboratorial dos resultados obtidos para uma determinada análise pelo mesmo analista ou por outros analistas ⁽⁵⁾.

Semanalmente, no Laboratório de Saúde Pública da Guarda, são feitos ensaios em duplicado para cada parâmetro analisado, a partir de amostras natural ou artificialmente contaminadas.

De três em três meses, o Laboratório assegura a verificação da consistência dos resultados dos diferentes analistas ao efetuar análises em duplicado por analistas diferentes. Esta análise é efetuada para cada parâmetro analisado, a partir de amostras natural ou artificialmente contaminadas ⁽⁵⁾.

Outra situação em que se utiliza a análise de amostras em duplicado é quando o Laboratório participa em ensaios interlaboratoriais.

Quando se pretende avaliar se a diferença entre as contagens feitas por diferentes analistas não é superior a 10%, com uma periodicidade mensal, contam-se os números de UFC para amostras positivas e comparam-se os resultados das contagens entre os diferentes analistas ⁽⁵⁾.

5.2. CONTROLO DE QUALIDADE DO MATERIAL E EQUIPAMENTOS

A produção de resultados com qualidade requer instalações e equipamentos que sejam pelo menos adequados. Deve ser feito, semanalmente, um controlo ambiental e sempre que os limites forem ultrapassados devem ser tomadas medidas corretivas.

Também, a esterilidade do material deve ser assegurada procedendo-se, para isso, a verificações periódicas.

5.2.1. Instalações

As instalações do Laboratório de Saúde Pública seguem os requisitos da ISO e foram anteriormente descritas.

Outro fator que pode interferir com os bons resultados obtidos é a boa qualidade bacteriológica do ar e das superfícies.

a) Ar ambiente

No início de cada sessão de trabalho é registada a temperatura da sala de trabalho que deve encontrar-se no intervalo entre os $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ^(4,5).

Em cada sessão de trabalho deve-se sempre controlar o ar ambiente junto ao local das sementeiras, quer esta seja feita pelo método de membrana filtrante ou pelo método de incorporação. Este controlo faz-se expondo uma placa com um meio não seletivo – *Water Plate Count Agar* (WPCA), junto às rampas de filtração ou ao bico de *Bünsen* durante 15 minutos ⁽⁵⁾.

Também, quando se faz a preparação e distribuição de meios de cultura, deve-se fazer o controlo do ar junto ao local de distribuição de meios do mesmo modo descrito em cima.

Estas placas, tal como as anteriores, deverão ser incubadas a 22°C durante 48 horas. Para serem válidos/conformes, os resultados das leituras deverão ser inferiores a 3 UFC por placa.

Uma vez por mês, deve-se proceder ao controlo da câmara de segurança biológica, onde se efetuam as repicagens, expondo um placa com meio não seletivo WPCA no interior da câmara com o fluxo de ar ligado durante uma hora. Estas placas vão incubar a 37°C durante 48 horas. Aqui, os resultados, para serem válidos/conformes, devem ser inferiores a 1 UFC por placa ⁽⁵⁾.

Quando estes valores são não conformes, deve-se proceder às devidas ações corretivas. Assim, deve-se proceder à limpeza da sala onde ocorreu a não conformidade e colocar-se novas placas neste local. Se a violação da conformidade continuar a ser registada, procede-se à esterilização do ar utilizando um esterilizador do ar.

Quando o resultado não conforme ocorre junto às rampas de filtração faz-se passar, durante 30 minutos, ar por membranas colocadas na rampa de filtração. As placas de WPCA com estas membranas vão a incubar a 22°C durante 72 horas. Se a não conformidade voltar a ocorrer, deve-se proceder à esterilização do ar utilizando um esterilizador de ar ⁽⁵⁾.

b) Superfícies

O controlo das superfícies é feito trimestralmente após a desinfeção. A exceção vai para o controlo das bancadas junto às rampas de filtração que é feito semanalmente.

i. Sala de trabalho – junto às rampas

Pressiona-se uma placa de contacto aberta com um meio não seletivo durante 10 segundos em frente às rampas, após a desinfeção com álcool a 70%. Estas placas vão incubar a 37°C durante 24 horas. Os critérios de aceitação são inferiores ou igual a 3 UFC por placa ⁽⁵⁾.

ii. Estufas de incubação

Após a desinfeção da incubadora com álcool a 70%, pressiona-se, com uma placa aberta com meio não seletivo, cada prateleira da estufa, durante 10 segundos. Estas placas vão a incubar a 37°C durante 24 horas. Os critérios de aceitação também são inferiores ou igual a 3 UFC por placa ⁽⁵⁾.

Quando existe alguma não conformidade num destes pontos procede-se à verificação da eficácia. Aqui, repete-se o procedimento descrito anteriormente nos pontos onde se verificou a não conformidade e volta-se a incubar, também como descrito anteriormente. Se esta violação persistir, deve-se averiguar a causa e avaliar caso a caso todas as possíveis implicações no trabalho realizado ⁽⁵⁾.

5.2.2. Controlo de esterilidade do material adquirido

a) Frascos de colheita adquiridos

Cabe ao Laboratório de Saúde Pública garantir a esterilidade dos frascos de colheita, quer estes sejam preparados no laboratório, quer sejam adquiridos já esterilizados. A verificação da esterilidade destes é uma condição imprescindível para a aceitação da entrega. Os ensaios de esterilidade destes frascos devem ser feitos na razão de 1 para 100 para o lote em uso. Este ensaio diz respeito ao lote adquirido e só deve ser repetido caso haja uma mudança de lote ou se verifique alguma contaminação ⁽⁵⁾.

Para se verificar a esterilidade destes frascos deve-se colocar cerca de 20 a 50 mL de WPCA fundido no frasco a ser testado. De seguida forram-se as paredes com o meio nutritivo, pela rotação do frasco durante o arrefecimento. Este vai a incubar a 22°C durante 5 dias, sendo o critério de aceitação inferior a 1 UFC por frasco ⁽⁵⁾.

b) Placas de Petri



Ilustração 3 - Placas de Petri

Fonte: www.google.pt

Também aqui, a verificação da esterilidade é uma condição importante para a aceitação da entrega. Os ensaios de esterilidade devem ser feitos para o lote em uso na proporção de 1 para 100. Este ensaio diz respeito ao lote das placas de Petri e só deve ser repetido quando houver mudança de lote ou quando se detetar alguma contaminação.

Deve-se colocar WPCA fundido na placa de Petri (Ilustração 3) a testar, esta vai a incubar a 22°C durante 5 dias e os critérios de aceitação definem que não deve existir crescimento nas placas ⁽⁵⁾.

c) Membranas filtrantes

A verificação da esterilidade é comprovada pelo certificado fornecido pela casa comercial. O Laboratório de Saúde Pública verifica a esterilidade sempre que efetua o ensaio em branco para cada sessão de trabalho ⁽⁵⁾.

5.3. PROCEDIMENTO PARA A HIDRATAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS LENTÍCULAS DO MATERIAL DE REFERÊNCIA

Como já foi referido anteriormente, fazem parte do CQA todos os procedimentos efetuados pelo laboratório para que se possa realizar a avaliação contínua do trabalho



Ilustração 4 - Lentículas

NCTC da HPA

Fonte:

http://www.hpacultures.org.uk/media/C53/C1/10_HPA_LENTICULES.jpg

realizado, tendo como principal objetivo assegurar a consistência dos resultados obtidos e assegurar a sua conformidade com os critérios definidos ⁽⁵⁾.

Os materiais de referência são de extrema importância para a implementação do controlo de qualidade pois têm valores bem estabelecidos, o que lhes confere confiabilidade para a comparação de resultados. Os materiais de referência aqui usados são as lentículas NCTC da HPA (Ilustração 4).

As lentículas das diversas estirpes que são usadas para o controlo interno do Laboratório de Saúde Pública são ⁽⁵⁾:

- 🌀 Clostridium perfringens* NCTC 13170
- 🌀 Enterococcus faecalis* NCTC 775
- 🌀 Escherichia coli* NCTC 9001
- 🌀 Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10662
- 🌀 Staphylococcus aureus* NCTC 657
- 🌀 Staphylococcus epidermidis* NCTC 11047
- 🌀 Micrococcus luteus* NCTC 2665

A hidratação das lentículas é feita semanalmente e segue o seguinte protocolo interno ⁽⁵⁾:

1. Retirar os recipientes que contêm as lentículas do congelador, certificando-se que a sílica gel se mantém com uma cor amarelada;
2. Manter as amostras à temperatura ambiente cerca de 15 minutos;
3. Abrir o recipiente cuidadosamente de modo a que a lentícula não fique retida na tampa;
4. Retirar a tampa e inverter o recipiente sobre um balão volumétrico de 100 mL, contendo aproximadamente 90 mL de diluente de recuperação máxima – peptona. Aqui é preciso assegurar-se de que a lentícula foi transferida para o diluente;
5. Quando a lentícula entrar em contacto com o diluente, esta irá flutuar ou afundar. Não se deve agitar o balão volumétrico;
6. Manter os balões volumétricos à temperatura ambiente durante 10 minutos;
7. Apertar bem a rolha do balão e agitar 30 vezes em 15 segundos;
8. As amostras devem ser processadas o mais rápido possível e devem ser tratadas como uma amostra de rotina do laboratório;
9. As amostras, por fim, vão ser semeadas nos meios seletivos pela técnica da membrana filtrante.

Os primeiros 10 resultados obtidos para cada estirpe vão ser utilizados para a elaboração da carta guia. Após a obtenção de 20 resultados vão ser recalculados os limites e a carta controlo vai ser reajustada.

As contagens obtidas para cada estirpe são analisadas de forma a verificar se estão dentro dos limites estipulados pela carta guia. Quando estes resultados não estão

conformes, deve-se identificar a causa e sempre que possível deve-se repetir o material de referência ⁽⁵⁾.

5.4. MEIOS DE CULTURA

O conhecimento das exigências nutricionais dos microrganismos permite elaborar meios que vão permitir o crescimento destes em **meios de cultura**. Na composição dos meios de cultura, estes deverão incluir nutrientes indispensáveis ao desenvolvimento do organismo em causa, em concentrações adequadas e não tóxicas ⁽²⁾.

O meio de cultura, para além dos nutrientes, deve ser um **meio estéril**, não deve conter quaisquer organismos vivos. Como os microrganismos são de dimensões reduzidas dispersam-se mais facilmente, logo é preciso proceder à esterilização do meio de cultura após a sua preparação, para eliminar os microrganismos contaminantes. Durante o manuseamento dos meios de cultura é necessário ter cuidados especiais a fim de não contaminar os meios. As técnicas usadas para a prevenção de contaminações são designadas de **técnicas de assepsia**.

Os meios de cultura podem ser classificados de acordo com três aspetos principais: estado físico (líquido, sólido e semi-sólido), composição química (quimicamente complexos ou quimicamente definidos) e objetivos funcionais (simples, seletivos, diferenciais ou enriquecidos) ⁽²⁾.

O que torna um **meio líquido** num meio sólido é a adição de um **agente solidificante**, por exemplo o **agar**, ao meio de cultura. O agar funde à temperatura de 100°C e permanece no estado líquido até que atinga temperaturas de 40 a 42°C, temperatura esta que não afeta a maioria dos microrganismos. O agar, ao contrário da gelatina – outro solidificante, não é biodegradado pelos microrganismos, não perdendo o seu poder solidificante. Os **meios sólidos** fornecem, portanto, uma superfície firme onde os microrganismos crescem em colónias. Os **meios semi-líquidos** contêm agar em concentrações inferiores e são usados para permitir a mobilidade dos microrganismos ⁽²⁾.

Em relação à composição química, um meio diz-se **quimicamente definido** quando a sua composição química é conhecida e **quimicamente complexo** se a sua composição química exata não é conhecida. Este meio é feito com extratos de leveduras, extratos de carne, leite ou outros componentes e são usados em rotina laboratorial, pois permitem o crescimento de uma gama largada de microrganismos ⁽²⁾.

Devido às reduzidas dimensões dos microrganismos, a quantidade de informação é limitada quando se pretende estudá-los de forma individual. Assim, é preferível estudar uma população de microrganismos que são obtidos em condições bem definidas – **culturas**. Quando uma cultura tem apenas um tipo de microrganismo é conhecida por **cultura pura** ou **axénica** e quando tem mais de um tipo de microrganismo é uma **cultura mista** ⁽²⁾.

A cultura e isolamento de microrganismos são duas operações básicas em Microbiologia, em que **cultura** é o crescimento de populações microbianas em meios de cultura e o **isolamento** é a separação de um dado microrganismo a partir de populações mistas.

Qualquer meio adequado ao crescimento de um microrganismo específico vai ser, de algum modo, seletivo para ele. Quando as exigências para determinados microrganismos são conhecidas, é possível estabelecer algumas condições – temperatura de incubação, meio de cultura, que vão favorecer o seu crescimento no meio em detrimento de outros ⁽²⁾.

O isolamento de um microrganismo em cultura pura a partir de uma cultura mista requer o uso de meios seletivos e ou diferenciais.

Os **meios seletivos** suprimem o crescimento de microrganismos que não interessam e permitem o crescimento do microrganismo que se deseja isolar. Por exemplo: os sais biliares são agentes inibitórios para a maioria das *Gram positivos*, permitindo o crescimento das *Gram negativos* ⁽²⁾.

Num **meio diferencial** podem crescer diferentes tipos de microrganismos, mas devido ao diferente aspeto que os estes tomam nesse meio podem distinguir-se os diferentes tipos de colónias. Esta diferenciação manifesta-se em variações como: tamanho, cor da colónia, cor do meio de cultura. Por exemplo a *E. coli* fermenta a lactose do meio de Lauril Sulfato com a produção de ácidos, o que vai originar a viragem do meio para cor amarela e também a formação de colónias com esta cor (amarelas ou laranjas) ⁽²⁾.

Os **meios de cultura de enriquecimento** permitem o crescimento de uma espécie em detrimento de outras. Estes meios – gelose sangue, são muito nutritivos e permitem o crescimento de microrganismos com um crescimento fastidioso ⁽²⁾.

Os **meios de cultura comercializados** utilizados no Laboratório de Saúde Pública na área da microbiologia das águas são ⁽⁵⁾:

MEIO DE PSEUDOMONAS CN

Este é o meio seletivo utilizado para a contagem de *Pseudomonas aeruginosa* a 37°C.

Tem na sua composição: **hidrolisado de caseína**, sulfato de potássio e cloreto de magnésio que favorecem a produção de piocianina que é característica desta espécie; a **cetrimida** que é um inibidor seletivo de outras espécies de microrganismos e **agar** que é o agente solidificante, entre outros componentes. As colónias características apresentam, ainda uma cor verde com fluorescência em luz UV.

MEIO DE SKIM MILK

Este meio é utilizado como um teste confirmatório da espécie *Pseudomonas aeruginosa*, no caso de crescimento de colónias não características no meio *PSEUDOMONAS – CN*.

Tem na sua composição leite em pó. A *Pseudomonas aeruginosa* possui a enzima casease e o meio de SKIM MILK permite a deteção desta enzima pela coagulação ou digestão da caseína do leite.

MEIO DE MANITOL SALT AGAR (MSA)

Meio seletivo para o isolamento presuntivo de *estafilococos* patogénicos.

Tem na sua composição, entre outros **manitol** que vai ser fermentado pelos *estafilococos*, virando o meio para amarelo; **cloreto de sódio** em altas concentrações que é um inibidor seletivo; **vermelho de fenol** que é um indicador da viragem da acidificação do meio.

MEIO DE MEVAG

É o meio utilizado para a **determinação do tipo respiratório** dos *estafilococos*

Antes da utilização é necessário fazer a sua **regeneração** – retirar todo o oxigénio presente no meio, ao aquecer os tubos a 75°C durante 15 minutos.

A partir de uma colónia isolada semeia-se o meio com movimentos helicoidais, de baixo para cima.

Os *estafilococos* são bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas, logo vai verificar-se um crescimento ao longo de todo o meio, ficando, este, completamente amarelo.

MEIO DE NITRATO MOBILIDADE

Este meio serve para verificar a mobilidade bacteriana, bem como a redução de nitratos a nitritos, ou de nitratos diretamente a azoto livre.

A mobilidade do microrganismo é evidenciada quando ocorre um crescimento difuso por todo o meio e não só na estria da sementeira. A redução de nitratos é verificada quando se adicionam volumes iguais dos reagentes NIT A e NIT B ao meio. Quando se forma um anel vermelho na superfície do tubo houve redução de nitratos pelos microrganismos em estudo. Quando há a formação de um anel branco, este deve ser confirmado com a adição de pó de zinco, pois pode ter havido uma rápida redução de nitratos a azoto livre. Após a adição do pó de zinco, se se formar um anel vermelho, não houve redução de nitratos, mas se o anel permanecer transparente, estamos na presença de um microrganismo redutor de nitratos.

MEIO LACTOSE GELATINA

Este é o meio usado para a deteção da metabolização da lactose e da liquefação da gelatina por parte das estirpes presuntivas de *Clostridium perfringens*. As espécies de *Clostridium perfringens* fermentam a lactose presente no meio, provocando a acidificação do mesmo que muda de vermelho para amarelo e a liquefação da gelatina é dada pela liquefação total do meio.

GELOSE COLUMBIA 5%

Meio nutritivo enriquecido que é utilizado para a pesquisa de microrganismos com crescimento fastidioso como é o caso da estirpe *Clostridium perfringens*. Este meio contém sangue de carneiro ou de cavalo que permite a produção de zonas de hemólise que são características de algumas espécies bacterianas.

REAGENTE: BACTIDENT – COAGULASE

Este é o reagente usado para a deteção da enzima coagulase que é característica da espécie de *Staphylococcus aureus*. Este é composto pelo plasma liofilizado de coelho com EDTA.

A sua preparação consiste na dissolução do conteúdo de um frasco em 3mL de água destilada estéril. De seguida, divide-se em frações de 0,5mL em tubos de vidro esterilizado

e repicam-se 2 a 3 colónias isoladas, juntando-as ao tubo. Esta vai a incubar a 37°C durante 24 horas.

A coagulase é uma enzima que é capaz de coagular o plasma sanguíneo e é um indicador da patogenicidade dos *Staphylococcus aureus*.

REAGENTE: BACTIDENT – CATALASE

Este é o reagente utilizado para a deteção da enzima catalase que vai diferenciar o género *Staphylococcus* do género *Streptococcus*. Este é composto por peróxido de hidrogénio a 3%.

O seu procedimento consiste na colocação de uma gota do reagente numa lâmina limpa e adicionar 1 ou 2 colónias isoladas suspeitas, de seguida observa-se a formação ou não de bolhas de gás – oxigénio.

O peróxido de hidrogénio é um produto decorrente do metabolismo celular dos organismos expostos ao oxigénio atmosférico. Como o peróxido é tóxico para as células, tem que ser rapidamente convertido numa espécie química que seja inofensiva. A catalase cliva o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio. Este teste ajuda a diferenciar o género *Staphylococcus* – catalase positiva, do género *Streptococcus* – catalase negativa.

REAGENTE: OXIDASE

Este teste permite detetar a presença ou a ausência da enzima citocromo oxidase presente em alguns microrganismos.

O reagente, antes do seu uso, deve ser reconstituído em 5mL de água destilada e deve ser guardada ao abrigo da luz pelo período máximo de uma semana.

Aqui, colocam-se algumas gotas do reagente num papel de filtro e adicionam-se 1 a 2 colónias isoladas suspeitas, observando-se o aparecimento de uma cor rosa, quando positivo ou então não se observa qualquer alteração – reação negativa. Para a validação deste teste recorre-se ao teste de controlo de confirmação usando um controlo positivo – *Pseudomonas aeruginosa* e um controlo negativo – *E. coli*. Este teste é usado para diferenciar a família das *Enterobacteriaceae* – oxidase negativa da família das *Pseudomonaceae* – oxidase positiva.

REAGENTE DE KOVAC'S

Este reagente permite a pesquisa de microrganismos produtores de *indol*.

Adicionam-se algumas gotas deste reagente ao meio de Fluorocult (contém triptofano) e observa-se a formação de um anel vermelho cereja na superfície do tubo (positivo) ou de um anel incolor (negativo).

Alguns microrganismos têm a capacidade de degradar o triptofano em ácido pirúvico, amónia e *indol*, que vai reagir com o 4-dimetilaminobenzaldeído presente no meio para formar um anel vermelho no cimo do tubo.

Em relação aos **meios de cultura liofilizados**, estes podem existir sob a forma de granulados ou pó. Os meios granulados têm a vantagem de se manipularem, pesarem e dissolverem melhor. Os meios granulados reduzem, ainda a aspiração de substâncias tóxicas para o operador, facilitam a pesagem e a sua dissolução é muito mais rápida. Depois de pesados, junta-se o meio a água fria e nunca o contrário, deixa-se absorver por alguns minutos e agita-se algumas vezes para a dissolução total (caldos) ou aquece-se e agita-se para que a dissolução do agar seja completa (agares) ⁽⁵⁾.

O armazenamento deste é feito num local seco, fresco e escuro, pois a humidade, o calor e a luz podem induzir alterações importantes nos meios. Todos os meios contêm agentes higroscópios – têm tendência a absorver a humidade do ar, logo devem ser bem fechados a seguir à sua utilização; alguns meios possuem componentes termo-sensíveis, pelo que devem ser armazenados a temperaturas entre os 12 a 21°C ⁽⁵⁾.

Os meios utilizados no laboratório de microbiologia das águas são ⁽⁵⁾:

WATER PLATE COUNT AGAR (WPCA)

Este é o meio usado para a enumeração da flora aeróbia total das águas.

O crescimento dos microrganismos é favorecido pelas substâncias nutritivas presentes neste meio

O seu modo de preparação passa por pesar a quantidade indicada pelo fornecedor e suspender o meio em água destilada. Distribui-se o meio preparada em frascos de 500mL e leva-se a esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Por fim, identificam-se os frascos, marca-se a data e arruma-se no frigorífico depois de atingir a temperatura ambiente.

MEMBRANE LAURIL SULFATO BROTH (LSA)

Este é o meio usado para a contagem de *coliformes totais* e a *E. coli*.

Este contém lactose que vai ser degradada pelas *coliformes* presentes na amostra, o que vai acidificar o meio, tornando-o amarelo. As colónias suspeitas presentes neste meio vão ter uma coloração entre amarelo a laranja.

O seu modo de preparação passa por pesar a quantidade de meio desidratado indicado pelo fornecedor, suspender o meio em água destilada e ferver até à completa dissolução. De seguida esteriliza-se o meio em autoclave a 121°C durante 15 minutos e distribui-se o meio em placas de Petri estéreis e em ambiente de assepsia. Identificam-se as placas, datam-se as mesmas e arrumam-se no frigorífico depois de atingirem a temperatura ambiente.

SLANETZ & BARTLEY (SB) MEDIUM

Meio usado para a identificação e pesquisa de *streptococos fecais*.

Estes, quando presentes, reduzem o cloreto de tetrazolium (TTC), presente no meio, a formazona que vai ser responsável pela coloração avermelhada das colónias. A azida sódica, outro componente do meio, vai inibir o desenvolvimento de outros microrganismos.

Para a preparação deste meio, começa-se por pesar o meio desidratado e suspende-se o mesmo em água destilada. De seguida deve-se ferver o meio até à completa dissolução deste e não vai a autoclavar. Em ambiente de assepsia, deve distribuir-se o meio por placas de Petri identificando-as e datando-as. Quando estas atingirem a temperatura ambiente devem ser arrumadas no frigorífico.

GELOSE DE BILIS ESCULINA

Meio usado como teste confirmatório para a pesquisa de *streptococos fecais*.

Este meio contém esculina que vai ser degradada pelos *streptococos fecais*, originando um halo negro de esculitina e glucose que está associado ao ferro em volta das colónias. A esculitina liga-se ao citrato de ferro, presente no meio, para formar um complexo negro que vai dar cor às colónias características. A presença de azida sódica e da bÍlis tem como função a inibição do crescimento de outro tipo de bactÉrias. As colónias características de *streptococos fecais* apresentam-se com uma cor negra e um halo também negro que vai ser difundido no meio.

Tal como os anteriores, este meio deve ser pesado primeiro, depois suspenso em água destilada e por fim deve-se ferver até à dissolução completa do meio. Este, depois,

deve ser distribuído em tubos de vidro e esterilizado em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Por fim, após o arrefecimento e a sua identificação, deve-se arrumar no frigorífico.

MEIO DE TRIPTOSE SULFITO AGAR/CICLOSERINA (TSA/TSC)

Este é o meio utilizado para a pesquisa e quantificação das espécies *Clostridium perfringens* (TSC) e dos esporos de *Clostridium* sulfito-redutores (TSA).

O metabisulfito de sódio e o citrato amónio férrico, presentes no meio, são indicadores da redução de sulfitos pela espécie de *Clostridium*. As colónias características vão apresentar uma cor negra. No meio de TSC, a cicloserina funciona como um inibidor seletivo para outras espécies de bactérias.

Para a preparação de TSA deve-se pesar o meio desidratado de acordo com as indicações do fornecedor, suspender o meio em água destilada e levar a ferver até à completa dissolução. De seguida, deve-se esterilizar o meio a 121°C durante 15 minutos. Em ambiente de assepsia deve-se distribuir o meio por placas de Petri estéreis e, por fim, depois de atingirem a temperatura ambiente e de estarem devidamente identificadas, devem ser arrumadas no frigorífico.

O modo de preparação do TSC vai ser semelhante, mas após a esterilização do meio em autoclave deve-se esperar que este arrefeça, atinja uma temperatura entre os 45 a 50°C para se adicionar o suplemento de cicloserina, previamente reconstituído com água destilada estéril. Após a adição, deve-se homogeneizar o meio e distribuí-lo em placas de Petri, em ambiente estéril e identificar, datar e guardar no frigorífico após atingir a temperatura ambiente.

FLUOROCULT

Meio utilizado para a deteção e enumeração de coliformes, em particular a *E. coli*.

Este meio contém cloreto de sódio que inibe o crescimento de bactérias Gram positivos. Outro componente do meio é a lactose que vai ser degradada pela *E. coli*, acidificando o meio e mudando a cor deste de púrpura para amarelo. A *E. coli* também vai ser produtora de *indol*, que se confirma com a adição do reagente de Kovac's e apresenta fluorescência.

A sua preparação inclui a pesagem do meio desidratado segundo as indicações do fornecedor, suspender o meio em água destilada e a sua agitação até à completa dissolução. De seguida, distribui-se o meio por tubos de vidro e vai a esterilizar na autoclave a 121°C

durante 15 minutos. Após atingir a temperatura ambiente, identificar e datar, deve-se arrumar os tubos no frigorífico.

5.5. PROCEDIMENTO PARA A PREPARAÇÃO E ARMAZENAMENTO DE MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura têm várias formas: granulados, pós, comercializados, em placas ou em tubos, na forma sólida ou na forma líquida.

Para a sua preparação devem-se utilizar componentes de qualidade comprovada e deve-se utilizar sempre água destilada ou desionizada livre de substâncias que possam inibir o crescimento bacteriano ⁽⁵⁾.

O armazenamento deve ser feito num local seco, fresco e escuro pois a humidade, calor e a luz podem induzir alterações na composição dos meios.

Na preparação de meios desidratados deve-se sempre registar a data de abertura do meio, estabelecer a data de validade dos meios preparados, verificar o aspeto e medir o pH, fazer o controlo da esterilidade, bem como o controlo positivo e negativo ⁽⁵⁾.

O pH dos meios deve ser medido após a esterilização destes e quando os mesmos atingem a temperatura ambiente. Os seus valores devem situar-se entre os $\pm 0,2$ unidades de pH do definido pelo fabricante ⁽⁵⁾. Por exemplo: os valores de pH do LSA devem situar-se entre os $7,4 \pm 0,2$ e o WPCA deve situar-se entre os $7,2 \pm 0,2$.

Os testes de esterilidade são feitos usando uma placa ou tubo do início da distribuição do meio e a última placa ou tubo distribuído. De seguida estas placas ou tubos vão a incubar a 37°C durante 24 horas ou o que estiver estipulado pelo fornecedor. Estes testes não devem ter contagem de UFC ⁽⁵⁾.

Quando se faz a distribuição dos meios, deve-se proceder à sua identificação. Assim, nos tubos ou nas placas devem ser registados os números de lote interno atribuídos ⁽⁵⁾. Por exemplo: na preparação do meio de Slanetz & Bartley deve-se colocar *SB dia-mês-ano* (SB 24-04-3013) bem como a data de validade do mesmo.

Também é importante fazer um controlo positivo e negativo quando se faz a preparação de um meio, para se verificar a produtividade deste, ou seja, o crescimento de uma estirpe controlo que apresenta as características esperadas para o fim a que o meio se destina ⁽⁵⁾. Por exemplo: num meio de LSA, para controlo positivo utiliza-se a *E.coli* que vai fermentar a lactose do meio e para controlo negativo utiliza-se os *estafilococos aureus*

que não têm qualquer crescimento neste meio, pois vão ser inibidos pelo lauril sulfato de sódio, um componente deste meio.

Para o controlo positivo e controlo negativo dos meios deve-se utilizar sempre as estirpes do material de referência e deve-se utilizar os microrganismos estipulados pelo fabricante do meio de cultura ⁽⁵⁾.

Todos os meios devem ser armazenados ao abrigo da luz, humidade e a uma temperatura entre os $5\pm 3^{\circ}\text{C}$.

Quanto à validade dos meios utilizados, de uma maneira geral, estes variam entre as 2 a 4 semanas para as placas (meios de LSA, SB, entre outros); 3 a 6 meses para os tubos (meio nitrato de mobilidade, meio lactose gelatina) e 1 semana para os meios com suplemento (TSC) ⁽⁵⁾.

Os meios preparados e armazenados em frascos que se destinam a fundir, devem ambientar antes de serem fundidos, e uma vez fundidos não se devem voltar a fundir.

Outro aspeto fundamental a ter em conta, é que deve-se sempre utilizar primeiro os meios mais antigos ⁽⁵⁾.

5.6. COLHEITA E TRATAMENTO DE AMOSTRAS DE ÁGUAS

Uma amostra é um volume muito pequeno de uma água a ser investigada. A dispersão, espécies e número de microrganismos deve ser representativo de todo o sistema de água de onde foi colhida ⁽⁴⁾.

Uma série de fatores pode influenciar a distribuição dos microrganismos, tais como: a flora das matérias-primas, a homogeneização e manuseamento das amostras e a temperatura de armazenamento. A contaminação, também pode causar um crescimento do número de microrganismos presentes numa amostra.

A amostragem tem por finalidade fornecer informações sobre as características microbiológicas das águas que vão ajudar a avaliar a existência de perigo ou não para a saúde pública ⁽⁴⁾.

Como para cada tipo de amostra existem objetivos diferentes, estes têm que ser definidos desde o início ⁽⁴⁾.

Para que os resultados obtidos aquando a realização dos vários testes possam ser fidedignos é importante que se faça uma correta amostragem ⁽⁴⁾.

No Laboratório de Saúde Pública da ULS da Guarda são analisadas amostras de três tipos de águas: abastecimentos, termas e águas para fins recreativos – piscinas.

a) Águas de Abastecimento

As colheitas de amostras de águas para consumo humano devem ser efetuadas: no ponto interior de uma instalação ou estabelecimento onde a água sai das torneiras e é normalmente utilizada para o consumo humano, se a água for fornecida através de um sistema de distribuição; no ponto de entrega ao consumidor, no caso de um sistema municipal; no fim da linha de enchimento, caso se trate de uma água à venda em garrafas e outros recipientes, com ou sem fins comerciais e no ponto de utilização, no caso de ser uma água utilizada numa empresa da indústria alimentar ^(4,6,7).

As amostras devem sempre ser colhidas em ambiente de assepsia, os frascos utilizados para a colheita devem ser estéreis e devem conter tiosulfato de sódio (inibe a ação do cloro, não permitindo que este interfira com a flora microbiana da amostra) na concentração de 10 a 12mg por 500mL ^(4,5,6,7).



Ilustração 5 - Passos a seguir na colheita de uma amostra de água de abastecimento

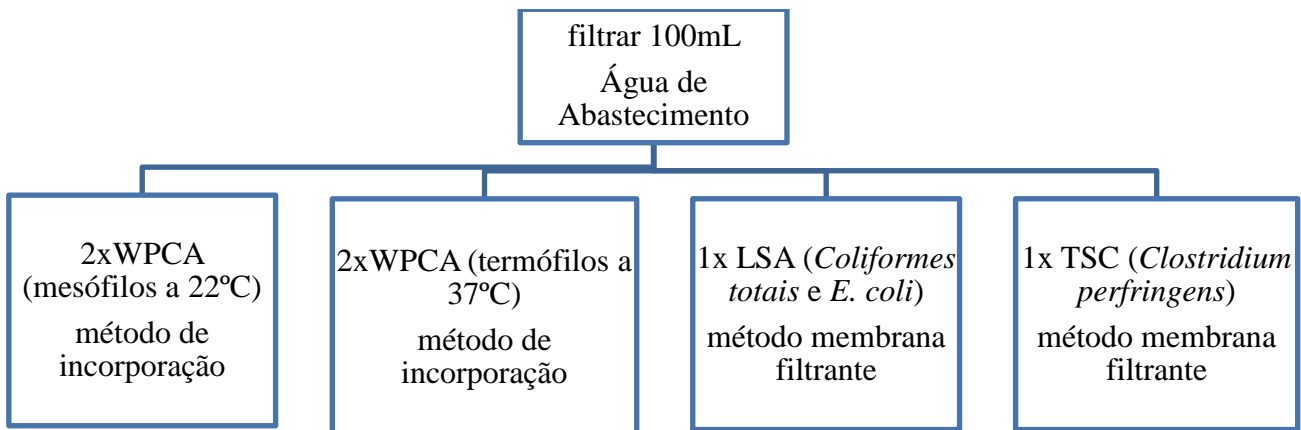
Fonte:

http://pinheiroambiental.com.br/home_arquivos/Analise.JPG

Para realizar a colheita da amostra numa torneira é necessário que o técnico tenha lavado e desinfetado as mãos, retire qualquer filtro que a torneira possa ter e deixe correr a água durante algum tempo para se esgotar a água que tenha estado parada na canalização. De seguida, deve flamejar bem a torneira, no interior e exterior, com um flamejador, ou então, no caso de o material ser de plástico, deve desinfetar com álcool a 70°. Abre-se novamente a torneira e deixa-se correr a água até que esta arrefeça. Neste momento abre-se o frasco e colhe-se a água, mantendo o frasco inclinado para evitar contaminações pelo ar. A tampa do frasco deve ser mantida não mão e o técnico deve ter o cuidado de não tocar no interior do frasco ou no gargalo do mesmo. O frasco deve encher-se até dois terços e deve fechar-se imediatamente. No rótulo do frasco deve colocar-se o ponto de amostragem, o nome do requisitante e a data da colheita (Ilustração 5). As amostras são, depois, transportadas em caixas isotérmicas com placas de gelo até 6 horas depois da colheita. As

análises devem ser feitas o mais rapidamente possível, nunca ultrapassando as 12 horas após a colheita ^(4,6,7).

A sementeira das amostras das águas de abastecimentos faz-se de acordo com o seguinte esquema:



Esquema 1 - Sementeira de amostras de águas de Abastecimento

b) Termas

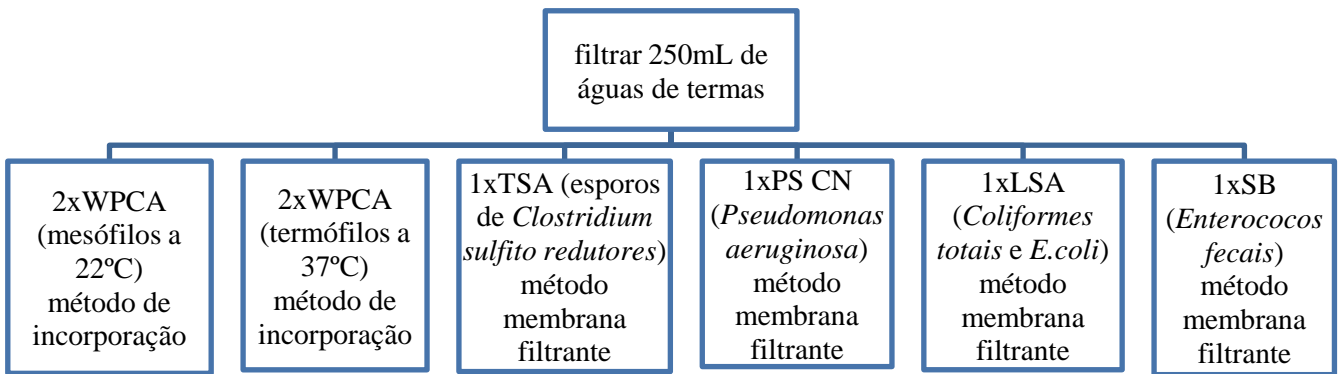
Um estabelecimento termal ou balneário presta cuidados de saúde, aproveitando as propriedades terapêuticas de uma água mineral natural (água bacteriologicamente própria de circulação profunda, com propriedades físico-químicas estáveis, de que resultam propriedades terapêuticas ou simplesmente favoráveis à saúde ⁽⁸⁾) ou de uma nascente natural (águas subterrâneas naturais que conservam as propriedades para beber ⁽⁸⁾) para fins de prevenção da doença, terapêutica, reabilitação ou manutenção da saúde, podendo ainda prestar cuidados complementares e serviços de bem-estar termal ⁽⁹⁾. As termas são o local onde emergem as águas adequadas à prática do termalismo.

As águas minerais naturais utilizadas nos estabelecimentos termais estão sujeitas a controlo laboratorial com a realização de análises microbiológicas.

As colheitas das águas para análise devem-se realizar no ponto de captação e nos diferentes postos de utilização ^(4,5).

Também aqui as colheitas devem ser feitas em frasco estéril com tiosulfato de sódio.

A sementeira das amostras das águas de termas faz-se de acordo com o seguinte esquema:



Esquema 2 - Sementeira de amostras de águas termais

c) Águas para fins recreativos – Piscinas

Existe um aumento da procura das piscinas para a prática de atividade desportivas, recreativas e terapêuticas. No entanto, notam-se algumas falhas no que respeita à qualidade destas águas, quer a nível da temperatura, quer a nível da renovação das águas ou mesmo na quantidade de desinfetante aplicado.

As amostras devem ser representativas de toda a extensão da água, sendo que os pontos de amostragem devem refletir a exposição dos banhistas, levando em conta que a maioria das crianças está mais exposta às áreas próximas da linha de água ^(4,5).

A frequência da amostragem deve ter em linha de conta a intensidade e o padrão temporal das atividades realizadas.

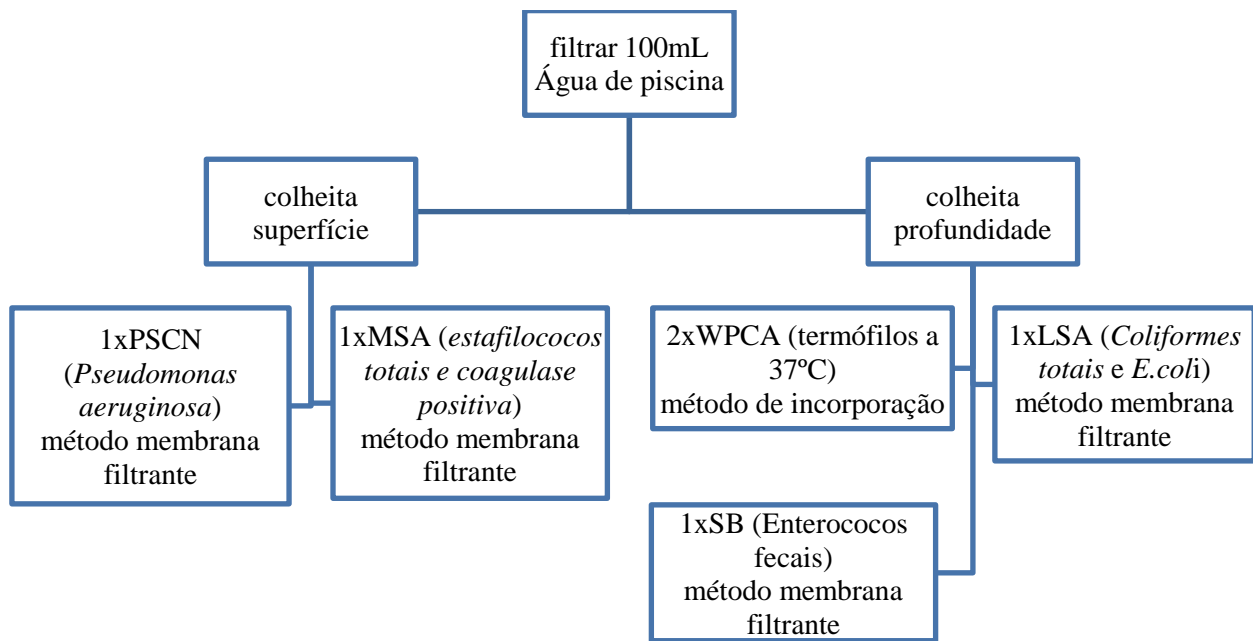
Assim, o local de colheita das amostras deve ser o mais longe possível da entrada da água na piscina, junto do rebordo interno, tendo o cuidado de se recolherem duas amostras diferentes: uma à superfície da água e outra em profundidade ⁽⁵⁾.

Colheita à superfície: remove-se a tampa do frasco junto à água e enche-se o frasco com movimentos circulares e lentos à superfície da água. O frasco não se deve encher completamente. Após a colheita, deve-se identificar corretamente a amostra e acondicioná-la em mala térmica ^(4,5).

Colheita em profundidade: submerge-se o frasco em posição vertical à profundidade pretendida. À medida que enche, deve ser movido suavemente para a frente, para evitar a contaminação causada pelo operador. Quando o frasco estiver cheio, fecha-se bem e identifica-se a amostra em mala térmica. O tempo entre as colheitas e a análise não deve ultrapassar as 6 horas ^(4,5).

A colheita desta amostra faz-se nestes dois locais consoante o tipo de microrganismos que se pretende pesquisar. Assim, à superfície faz-se a pesquisa de microrganismos aeróbios (*Pseudomonas* e *estafilococos totais* e *coagulase positiva*) e à profundidades faz-se a pesquisa de microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos (*Coliformes totais* e *E. coli* e *Enterococos fecais*)

A sementeira das amostras das águas para fins recreativos – piscinas faz-se de acordo com o seguinte esquema:



Esquema 3 - Sementeira de amostras de águas para fins recreativos - piscinas

5.7. PROTOCOLO PARA A RECEÇÃO DE AMOSTRAS DE ÁGUAS

Antes de se efetuar a análise das amostras, esta é a última parte importante do processo de amostragem. Aqui, é necessário um protocolo que estabelece as pessoas que têm autorização para receber as amostras e verificar se estas cumprem os parâmetros estabelecidos ⁽⁵⁾.

Assim, é importante verificar se as amostras foram recolhidas corretamente (se foi usado o frasco correto, se este se encontra bem fechado e se o volume da amostra é o correto), se o formulário de identificação das amostras está corretamente preenchido (ponto de amostragem, nome do requisitante e data da colheita) e verificar se o transporte foi feito em boas condições de higiene para evitar a contaminação das amostras, bem como se estas estão protegidas dos raios UV, luz visível e altas temperaturas ⁽⁵⁾.

5.8. PROCEDIMENTO PARA A SEMENTEIRA DE ÁGUAS PELO MÉTODO DE MEMBRANA FILTRANTE

Quando se faz a sementeira das águas pelo método da membrana filtrante (Ilustração 6) é preciso ter em atenção um conjunto de ações que permitem uma maior desinfeção dos pontos de filtração da rampa, o que vai evitar possíveis contaminações entre amostras ⁽⁵⁾.

Assim, antes do início da filtração das amostras é preciso ligar o bico de *Bünsen* de forma a proporcionar um ambiente de esterilidade junto à rampa de filtração; pulverizar os pontos de filtração com álcool a 96% e flamejar com o maçarico; queimar os discos e coloca-los nos pontos de filtração, flamejando-os de novo; retirar os copos dispensadores e coloca-los nos pontos de filtração, tendo sempre o cuidado de evitar a contaminação pelos copos; ligar a bomba e filtrar 100mL de hipoclorito de sódio a 3% e, de seguida, filtrar 100mL de água destilada estéril. Quando se acaba este procedimento, devem-se mudar os copos dispensadores. Quando se inicia a sementeira das amostras por membrana filtrante deve-se ter o cuidado de esterilizar a parte superior dos frascos de colheita e esterilizar a pinça com que são agarradas as membranas ⁽⁵⁾.

Entre cada amostra processada é importante filtrar, sempre, hipoclorito de sódio e água destilada estéril, flamejar os discos e colocar copos de filtração novos.



Ilustração 6 - Técnica da membrana filtrante

Fonte:

<http://interface.co.pt/images/produtos/MB4174-06842-ALL.jpg>

No final da filtração de todas as amostras, deve-se filtrar com hipoclorito de sódio e flamejar os discos ⁽⁵⁾.

Importa referir que as membranas aqui utilizadas têm uma porosidade de 0,22µm e 0,45µm e no fim da filtração, colocam-se estas membranas nas superfícies de meios de cultura sólidos, seletivos para o grupo de microrganismos que se pretende quantificar. Os resultados aqui obtidos são expressos em UFC por 100mL de amostra. Esta técnica vai ser aplicada a todas as amostras estudadas no Laboratório de Saúde Pública.

5.9. TÉCNICAS ESPECIAIS DE CULTURA DE MICRORGANISMOS

Alguns microrganismos como a *Mycobacterium leprae* (provoca a lepra), *Treponema pallidum* (provoca a sífilis) e a maioria dos parasitas intracelulares obrigatórios – vírus não se conseguem fazer crescer em meios de cultura ⁽²⁾.

Outros microrganismos exigem técnicas especiais de crescimento – microrganismos anaeróbios. Os anaeróbios estritos exigem a ausência total de oxigénio para o seu crescimento. Para esta finalidade criaram-se as jarras de anaerobiose (Ilustração 7) que criam estas atmosferas adequadas ⁽²⁾.



Ilustração 7 - Jarra de anaerobiose

Fonte:

http://www.probac.com.br/NewsLetter/NewsContinua/imagens/banner_principal_ed01-2012.gif

Adiciona-se, à jarra, um gerador de gás e um indicador. O oxigénio contido no jarro é quimicamente removido pelo gerador e o indicador muda de cor quando o ambiente se torna anaeróbico, permitindo o crescimento dos microrganismos.

Outro ponto que interessa referir é a obtenção de culturas puras, através de métodos de isolamento. Assim, para se poder caracterizar os microrganismos é necessário obtê-los por culturas puras. Estas culturas podem ser obtidas pelo **método de estrias** ou por **espalhamento em placas**, obtendo-se colónias perfeitamente individualizadas e espacialmente separadas que, em princípio, serão originadas a partir de uma única célula. Outro método para a obtenção de culturas puras é o **método por incorporação** do meio de cultura na amostra a analisar ⁽²⁾.

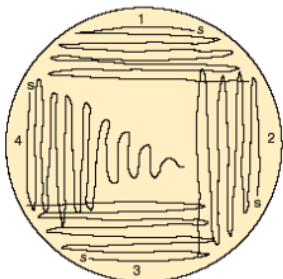


Ilustração 8 - Método de estrias

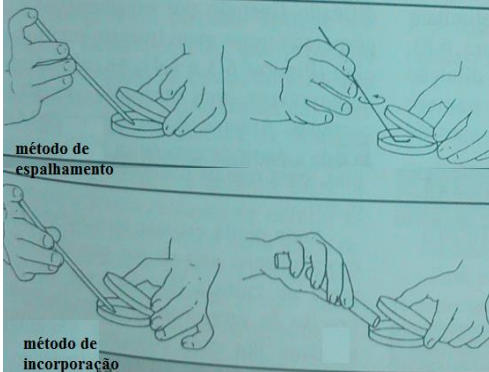
Fonte:

<http://coral.ufsm.br/microgeral/Praticas/Roteiro%20pratica%20semeaduras.pdf>

No **método de estrias** (Ilustração 8), com uma ansa que contém uma pequena porção de inóculo, risca-se superficialmente o meio de cultura. O riscado na placa faz-se pelo método dos quatro quadrantes, sendo que a estria de cada quadrante toca no final da estria do quadrante anterior arrastando bactérias deste último. Alternativamente pode-se fazer 3 estrias, a primeira ocupando metade da placa e as

outras duas um quarto da placa, sendo que neste modo as estrias não se tocam ⁽²⁾.

No **método por espalhamento** (Ilustração 9) pipeta-se a amostra diluída, cerca de



0,1mL sobre a superfície do meio de cultura sólido e espalha-se com a ajuda de uma vareta estéril dobrada em L – espalhador. Esta placa vai a incubar em posição invertida e as colónias aparecem individualizadas na superfície do meio ⁽²⁾.

No **método por incorporação** (Ilustração 9) pipeta-se a amostra diluída, 1mL, numa placa de Petri

Ilustração 9 - método de espalhamento e método de incorporação

Fonte: Canas, W. F., et all; 2000

estéril e adiciona-se o meio de cultura previamente liquefeito e mistura-se cuidadosamente. Deixa-se arrefecer e solidificar e leva-se a placa a incubar em

posição invertida. As colónias vão aparecer isoladas à superfície ou então, no interior do agar ⁽²⁾.

5.10. PROCEDIMENTO PARA A DESCONTAMINAÇÃO, LAVAGEM E ESTERILIZAÇÃO DO MATERIAL DE MICROBIOLOGIA

A descontaminação do material é feita pelo método de esterilização pelo calor e tem como finalidade a remoção de todos os microrganismos vivos – células vegetativas, vírus e esporos. A esterilização depende do tempo de exposição ao método selecionado ⁽⁵⁾.

O calor húmido - autoclave é mais eficiente e leva menos tempo. Para que a esterilização possa ser bem-sucedida é preciso que os microrganismos estejam em contacto direto com o calor e, se estiverem protegidos por camada de matéria orgânica ou dentro de embalagens é necessário algum tempo para que o calor as atinja. Os microrganismos não são inativados instantaneamente, devendo ser expostos durante um período de tempo a uma temperatura específica. O tempo de esterilização corresponde ao tempo a que os materiais estão a temperaturas de esterilização e não inclui o tempo de penetração ou o tempo de atingir a temperatura de esterilização ⁽⁵⁾.

Após a utilização do material, este é conduzido à sala de lavagem, dentro do carro do material ou de um tabuleiro próprio. Aqui, o material é colocado na zona do material para descontaminação.

Esta é feita em autoclave a 121°C durante 20 minutos. Após a descontaminação o material reutilizável vai para a zona de material sujo. O material descartável vai para o contentor do lixo ⁽⁵⁾.

Após a descontaminação do material, procede-se à lavagem manual do material. Aqui, deve-se mergulhar o material em água, detergente e lixívia a 5%. De seguida lava-se com água quente o material e enxagua-se bem e passa-se duas vezes por água desionizada. Deixa-se o material a escorrer e seca-se na estufa à temperatura de 90°C. Após este procedimento transfere-se o material para a mesa de esterilização. A esterilização, na estufa faz-se durante 60 minutos a 170°C. Após este procedimento guarda-se o material nos armários, atrás do material mais antigo ⁽⁵⁾.

6. CONTROLO DE QUALIDADE EXTERNA

O controlo de qualidade do laboratório garante a qualidade de todo o trabalho realizado e que este segue as normas estabelecidas, bem como permite que os materiais e equipamentos sejam conservados de forma correta ⁽⁵⁾.

A implementação do controlo de qualidade externa permite aos laboratórios participar de ensaios interlaboratoriais, de forma a testar a qualidade e eficiência do trabalho.

São efetuados 4 ensaios com duas amostras diferentes por ensaio que podem corresponder a águas de consumo humano – abastecimentos ou águas para fins recreativos – piscinas. As amostras são enviadas pelo Instituto Ricardo Jorge na forma de lentículas e posteriormente hidratadas segundo as indicações do fabricante ⁽⁵⁾.

A hidratação das lentículas segue o protocolo já referido anteriormente (ponto 5.3). Para a preparação dos meios de cultura e reagentes deve-se recorrer a componentes e produtos químicos de qualidade reconhecida ou utilizam-se meios e reagentes comercialmente disponíveis ⁽⁵⁾.

Estas amostras são tratadas como se fossem amostras de rotina.

Os resultados são registados na folha do relatório que acompanhou a amostra e devem ser enviados até à data limite. Posteriormente os resultados exatos serão enviados para o laboratório bem como a classificação deste ⁽⁵⁾.

7. CLASSIFICAÇÃO DAS ÁGUAS

Na tabela seguinte apresentam-se os diferentes tipos de águas pesquisados, os microrganismos pesquisados, as temperaturas e tempos de incubação, os meios de cultura utilizados, bem como os valores paramétricos admitidos ⁽⁵⁾.

Tipos de águas	Microrganismos pesquisados, temperaturas e tempos de incubação	Meios de cultura utilizados	Valores paramétricos			
			A	B	C	D
Abastecimento	<i>Termófilos</i> 37°C/48h	WPCA	-			
	<i>Mesófilos</i> 22°C/72h	WPCA	-			
	<i>Coliformes totais/ E.coli</i> 37°C/48h	LSA	0			
	<i>Clostridium perfringens</i> 44°C/24h	TSC	0			
Termas			A	B	C	D
	<i>Termófilos</i> 37°C/24h	WPCA	5	5	20	20
	<i>Mesófilos</i> 22°C/72h	WPCA	20	20	100	100
	<i>Coliformes totais/ E.coli</i> 37°C/48h	LSA	0	0	0	0
	<i>Enterococos</i> 37°C/48h	SB	0	0	0	0
	<i>Pseudomonas</i> 37°C/48h	Pseudomonas-CN	0	0	0	0
	<i>Esporos de Clostridium perfringens</i> 37°C/24h	TSA	0	0	0	0
Piscinas (Superfície)	<i>Estafilococos</i> 37°C/48h	MSA	0			
	<i>Pseudomonas</i> 37°C/48h	Pseudomonas-CN	0			
Piscinas (Profundidade)	<i>Mesófilos</i> 37°C/24h	WPCA	100			
	<i>Coliformes totais/ E.coli</i> 37°C/48h	LSA	10/0			
	<i>Enterococos</i> 37°C/48h	SB	0			

Tabela 1 - Classificação das águas

Fonte: Laboratório de Saúde Pública, ULS Guarda

A- Captação;

B- Água em contacto com as mucosas respiratórias, oculares e outras mucosas internas;

C- Água utilizada em banhos e duchas;

D- Linha de engarrafamento.

8. PESQUISA E QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS

No Laboratório de Saúde Pública da ULS da Guarda são pesquisados e quantificados os seguintes microrganismos:

- ↻ *Microrganismos cultiváveis – mesófilos e termófilos*
- ↻ *Clostridium perfringens*
- ↻ *Esporos de bactérias anaeróbias sulfito-redutoras*
- ↻ *Coliformes totais e E. coli*
- ↻ *Staphylococcus aureus*
- ↻ *Enterococcus faecalis*
- ↻ *Pseudomonas aeruginosa*

Segue-se, de seguida, uma descrição de cada um destes microrganismos.

8.1. PESQUISA E QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS CULTIVÁVEIS A 37°C E A 22°C

As águas contêm uma variedade de microrganismos derivados de várias fontes, tais como o solo e a vegetação. A quantificação dos vários números de microrganismos fornece uma informação útil para assegurar e vigiar a qualidade da água. As contagens são feitas para microrganismos capazes de formar colónias em agar a 37 e a 22°C ^(3,5).

A contagem das colónias vai ser útil para assegurar a integridade das fontes de águas, a eficácia dos processos de tratamento como a desinfeção e fornece, ainda, um indicador da qualidade da limpeza integridade dos sistemas de distribuição das águas.

Esta também pode ser usada para assegurar a capacidade de poder ser fornecida para a preparação de alimentos e bebidas, onde a água deve conter poucos microrganismos para evitar a contaminação dos produtos. O valor médio das colónias usado para monitorizar as alterações é baseado numa monitorização por períodos alongados. Quando existe um aumento brusco da contagem, este é um aviso precoce de poluição, que deve ser analisada.

As normas europeias especificam um método para a enumeração de microrganismos cultiváveis em agar nutritivo, em aerobiose a 37 e a 22°C ^(3,5).

Esta análise vai ser feita a todos os tipos de amostras tratadas. Nas águas de abastecimentos e termas faz-se a contagem do número de colónias que se desenvolvem em

gelose nutritiva a 37°C durante 48 horas e 24 horas respetivamente e a 22°C durante 72 horas, enquanto que nas piscinas apenas se faz a contagem a 37°C durante 24 horas.

O número de UFC deve ser contado por mL de amostra de água, a partir do número de colónias formadas no meio, sendo o meio aqui utilizado o WPCA ^(3,5).

Os **microrganismos cultiváveis** são todas as bactérias aeróbias, leveduras e fungos que são capazes de formar colónias num meio específico e nas condições anteriormente descritas.

O meio utilizado para a enumeração destes microrganismos é o WPCA, em que o crescimento de bactérias aeróbias é favorecido pelas substâncias nutritivas existentes na peptona e os fatores de crescimento estão presentes nas leveduras ⁽⁵⁾.

Procedimento para a enumeração de microrganismos mesófilos e termófilos:



Ilustração 10 - Microrganismos cultiváveis a 37°C e a 22°C em meio de WPCA

Fonte:

http://www.esb.ucp.pt/twt5/motor/display_texto.asp?pagina=numerototaldemicroorganismos200405117308664&bd=cec

Semeia-se quatro placas de Petri com 1mL de amostra (duplicado para cada temperatura). Adiciona-se o meio de cultura e incorpora-se por rotação das placas. O tempo entre a adição da amostra e a incorporação não deve exceder os 15 minutos.

As placas invertidas são incubadas, duas a 36±2°C durante 44±4h ou a 36±2°C durante 24 horas para as amostras de águas de nascentes naturais, minerais e termais e as outras duas a 22±2°C durante 68±4horas ^(3,5).

As placas são examinadas após serem retiradas das estufas. Contam-se as UFC (unidades formadoras de colónias) nas placas correspondentes às duas temperaturas e calcula-se a média do número de colónias (Ilustração 10).

Os resultados são expressos em UFC/mL de amostra para cada temperatura de incubação. Se não houve crescimento de colónias nas placas inoculadas, expressa-se o resultado em 0 UFC/mL; se crescerem mais de 300 colónias, expressa-se o resultado como superior a 300 UFC/mL.

Durante os procedimentos devem ser seguidos os procedimentos de controlo de qualidade referentes aos meios de cultura, controlo analítico (ensaios em branco) e controlo de temperaturas ^(3,5).

8.1. PESQUISA E QUANTIFICAÇÃO DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS

Os clostrídios sulfito redutores são organismos anaeróbios esporulados e redutores de sulfitos, considerados como indicadores de poluição fecal. A sua forma esporulada é muito mais resistente do que as formas vegetativas sendo, também resistente ao cloro.

Estes têm um papel auxiliar na avaliação de uma água. No trato intestinal do Homem e dos animais formam esporos que são resistentes à temperatura, ao contrário das células vegetativas. A monitorização do *Clostridium perfringens* em todas as fases do tratamento da água vai ser útil na avaliação da eficácia do tratamento ^(3,5,10).

Importa, ainda, fazer a distinção entre *Clostridium perfringens* **presumíveis** e *Clostridium perfringens* **confirmados**. As primeiras são bactérias Gram positivos, anaeróbias estritas formadoras de esporos, que produzem colónias de cor negra a castanhas amareladas em meio de Triptose Sulfito Cicloserina Agar (TSC) após a incubação a 44°C durante 24 horas. As segundas são bactérias que produzem colónias características em TSC, são imóveis, reduzem nitratos a nitritos, fermentam a lactose e liquefazem a gelatina.

Procedimento para a enumeração de *Clostridium perfringens*

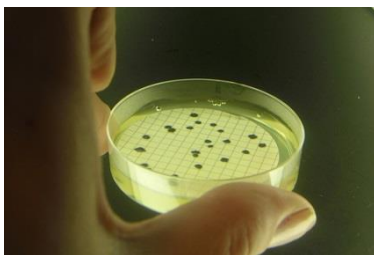


Ilustração 11 - *Clostridium perfringens*
em meio de TSC

Fonte: www.google.pt

A pesquisa e quantificação deste microrganismo faz-se pelo método da membrana filtrante, onde se utiliza uma membrana com 0,45µm de porosidade, sendo esse procedimento aplicado a uma amostra de água destinada ao consumo humano e, sempre que necessário, pode ser aplicado a outras amostras desde que não contenham partículas ou matérias em suspensão que possam interferir com a filtração ^(3,5).

Quando se faz a contagem de células vegetativas e esporos, o tratamento inicial com calor não é feito. Assim, filtram-se 100 mL de amostra através de uma membrana que vai ser colocada, com a face quadriculada voltada para cima, num meio diferencial de TSC, coberto com dupla camada de agar nutritivo (ajuda a produzir ambiente de anaerobiose) e incuba-se a 44°C durante 24 horas (Ilustração 11). Esta incubação é feita com as placas não

invertidas numa jarra de anaerobiose, onde se junta um indicador e um gerador deste ambiente.

A coloração característica destas colónias (negras a castanhas amareladas) deve-se à redução do sulfito a sulfureto que reage com o ferro presente no meio e a Cicloserina presente no meio serve de inibidor a outras espécies de *bacillus*^(3,5).

Contam-se as colónias características e, de seguida realizam-se os testes confirmatórios.

Confirmação de *Clostridium perfringens*

Para se fazer a confirmação de *Clostridium perfringens* a partir de colónias suspeitas deve-se recorrer a um conjunto de testes.

Assim, repicam-se colónias suspeitas para duas placas que contêm um meio nutritivo de gelose de sangue, onde uma vai incubar em aerobiose e a outra em anaerobiose, durante 24 horas a 37°C. Após o período de incubação observa-se o crescimento de colónias na placa que incubava a anaerobiose e a ausência de crescimento nas placas que incubavam em aerobiose^(3,5).

Nas colónias características de *Clostridium perfringens* visualizam-se zonas claras de hemólise na gelose de sangue. Os testes de confirmação - redução de nitratos, mobilidade, liquefação da gelatina e fermentação da lactose, realizam-se nas subculturas que apenas apresentam crescimento em anaerobiose – anaeróbios estritos.

Verificação da redução dos nitratos e da mobilidade

Antes da utilização do meio de Nitrato-Mobilidade, deve fazer-se a sua regeneração num banho em água em ebulição durante 15 minutos e, de seguida arrefece-se o meio rapidamente, provocando a sua solidificação.

Inocula-se o meio por picada e incuba-se em condições de anaerobiose a 37°C durante 24 horas. Após a incubação examinam-se os tubos para se verificar a ocorrência ou não de crescimento ao longo da estria da sementeira. A mobilidade é visível pelo crescimento difuso no meio, para além da estria^(3,5).

Quando se verifica a mobilidade, invalida-se a hipótese da presença de *Clostridium perfringens* sempre que haja um crescimento difuso ao longo do tubo, pois este microrganismo é imóvel.

Para testar a presença de nitratos adiciona-se a cada tubo uma quantidade igual de nitrato A e nitrato B. A formação de um anel vermelho confirma a presença de nitratos. Quando ocorre a formação de um anel transparente, deve confirmar-se a redução direta de nitratos a azoto livre, adicionando uma pequena quantidade de pó de zinco. Se se verificar a formação de um anel vermelho, comprova-se que não ocorreu redução direta de nitratos a azoto livre ^(3,5).

Verificação da fermentação da lactose e liquefação da gelatina

Também aqui, antes da utilização do meio, procede-se à sua regeneração e rápido arrefecimento.

Inocula-se o meio e incuba-se a $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Após a incubação em ambiente de anaerobiose, observa-se a fermentação da lactose que provoca a acidificação do meio (muda a cor de vermelho para amarelo), a produção de gás e a liquefação da gelatina.

O *Clostridium perfringens*, no meio de TSC agar produz colónias negras, é imóvel, reduz nitratos a nitritos, produz ácido e gás a partir da lactose e liquefaz a gelatina em 48 horas.

Em cada série de ensaios deve-se realizar um controlo positivo e negativo. Para isso, utiliza-se uma estirpe sem pasteurização da estirpe de *Clostridium perfringens* como controlo positivo e uma estirpe de *E. coli* como controlo negativo ^(3,5).

8.2. PESQUISA E QUANTIFICAÇÃO DE ESPOROS DE BACTÉRIAS ANAERÓBIAS SULFITO-REDUTORAS

Os esporos de bactérias anaeróbias sulfito-redutores estão muito difundidos no meio ambiente, estando presentes na matéria fecal humana e animal, assim como nas águas residuais e no solo. Estes esporos, ao contrário dos coliformes, sobrevivem muito tempo na água pois são resistentes à ação do cloro e de outros fatores físicos e químicos, podendo fornecer informações sobre uma possível poluição remota e ainda são úteis na avaliação da eficácia do tratamento das águas ^(3,5,10).

As bactérias anaeróbias sulfito redutoras são bactérias que produzem esporos, pertencem à família *Bacillaceae* e ao género *Clostridium*.

A pesquisa dos esporos presentes numa amostra requer a seleção destes, a filtração por membrana de 0,22µm e a sua incubação em ambiente de anaerobiose.

A seleção dos esporos faz-se através do aquecimento da amostra a 75°C durante 15 minutos, tempo suficiente para destruir as formas vegetativas. Após a filtração desta amostra faz-se a incubação da membrana em meio seletivo de TSA agar que contém sulfato de ferro, coloca-se uma dupla camada de gelose nutritiva que ajuda a preservar o ambiente de anaerobiose e a incubação é feita a 37°C durante 48 horas^(3,5).

Procedimento para a enumeração de esporos de *Clostridium perfringens*

Antes de se proceder ao ensaio faz-se uma pasteurização da amostra, cerca de 50 mL num banho de água a 75±5°C durante 15 minutos a partir do momento em que é atingida essa temperatura.

Para controlo da temperatura utiliza-se um tubo de ensaio com um volume de água semelhante ao da amostra, onde se coloca o termómetro.

Esta pesquisa é efetuada para amostras de águas de nascentes naturais, minerais ou termais.

Após a filtração dos 50 mL de amostra remove-se a membrana de 0,22µm de poro e coloca-se no meio de TSA com a face quadriculada voltada para cima e adiciona-se uma segunda camada de gelose nutritiva.

As placas não invertidas vão a incubar em jarra de anaerobiose a 37°C durante 24 e 48 horas.

Por fim, observa-se a membrana para ver se ocorreu a formação de colónias de coloração negra às 24 e às 48 horas^(3,5).

8.3. PESQUISA E QUANTIFICAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS E E. COLI

A presença de coliformes totais na água de distribuição torna essa água imprópria para consumo humano, uma vez que indica que o tratamento foi insuficiente ou que ocorreu uma contaminação posterior. Outras hipóteses que podem ser levantadas são as más condições em que a colheita foi feita ou a ocorrência de erros durante a análise da amostra.

Qualquer que seja a origem, esta representa um sinal de alerta pelo que se deve averiguar a origem da contaminação.

Os coliformes são bactérias Gram negativos, não formadoras de esporos, oxidase negativa, capazes de crescer em aerobiose e anaerobiose na presença de sais biliares, são capazes de fermentar a lactose com a produção de ácido em 48 horas quando incubados a 37°C e possuem a enzima β -galactosidase^(3,5,10).

A *E. coli* possui, para além das características dos coliformes, a capacidade de produzir indol a partir do triptofano em 24 horas a 44°C e/ou hidrolisam o 4-methylumbelliferil- β -D-glucuronideo (MUG), apresentando fluorescência à luz UV.

Importa distinguir *Bactérias lactose positivas* de *Bactérias coliformes* e de *E. coli*. Assim, as **Bactérias lactose positivas** são bactérias capazes de formar colónias em aerobiose a 37°C num meio de cultura seletivo de LSA com a produção de ácido; as **Bactérias Coliformes** são bactérias lactose positivas que não possuem oxidase e a *E. coli* é um coliforme capaz de produzir indol a partir do triptofano em 24 horas a 44°C, hidrolisa o MUG e apresenta fluorescência à luz UV.

O método passa pela filtração por membrana da amostra e a incubação desta num meio seletivo de LSA com posterior confirmação das colónias lactose positiva, confirmação e quantificação de Coliformes totais e *E. coli*.

As colónias características são contadas como bactérias lactose positiva. Para a confirmação de Coliformes totais e *E. coli* faz-se uma subcultura das colónias características selecionadas ao acaso e realizam-se os testes confirmatórios: lactose, oxidase, fluorescência e produção de indol^(3,5).

Procedimento para a enumeração de coliformes totais e *E. coli*

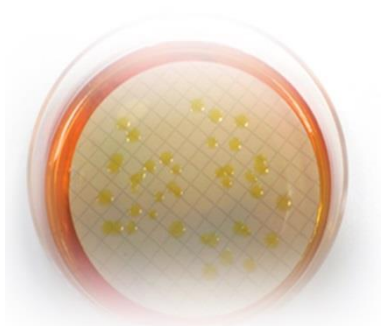


Ilustração 12 - Colónias suspeitas de *E.coli*
em meio de LSA

Fonte: ULS Guarda

Após a homogeneização da amostra filtram-se 100mL de amostra de águas de abastecimento e piscinas e 250mL de amostra de águas termais. Coloca-se a membrana com 0,45 μ m de porosidade num meio seletivo de LSA, certificando-se que não fica ar por baixo da membrana.

A placa incuba a 37°C durante 24 horas e observa-se o crescimento de colónias. Contam-se como colónias lactose positivas todas as colónias características, sem mencionar o tamanho, de cor amarela ou laranja à superfície da membrana (Ilustração 12).

Para se efetuarem os testes confirmatórios é necessário proceder à subcultura de todas as colónias características ou de um número representativo de cada tipo para um meio nutritivo não seletivo, WPCA, pois os testes confirmatórios não devem ser efetuados nos meios seletivos uma vez que podem influenciar os resultados, gerando resultados falso-positivos ou falso-negativos e deve-se recorrer a culturas puras para se fazerem os mesmos. As colónias a confirmar incubam a 37°C durante 24 horas em placas que contêm WPCA e procedem-se aos testes confirmatórios de Coliformes totais e de *E.coli* ^(3,5).

Testes de confirmação da presença de Coliformes totais

Uma das características dos coliformes é a ausência da enzima oxidase, logo este é um teste simples que elimina de imediato as colónias que apresentam esta enzima.

Colocam-se duas ou três gotas do reagente oxidase preparado previamente num papel de filtro. Com a ajuda de uma ansa de plástico espalha-se uma colónia no papel de filtro. O aparecimento de uma cor rosa-púrpura em 30 segundos indica que a oxidase é positiva.

Após a realização deste teste, eliminam-se todas as colónias oxidase positiva e repicam-se as colónias oxidase negativas para um tubo que contém Fluorocult que vai incubar a 37°C durante 24 horas. Observa-se a viragem da cor do meio de roxo para amarelo devido à acidificação do meio provocada pela fermentação da lactose, o que confirma a presença de bactérias coliformes totais ^(3,5).

Confirmação da presença de *E.coli*

Também aqui repicam-se as colónias que cresceram no meio de LSA para um meio não seletivo de WPCA que vai a incubar a 37°C durante 24 horas.

Após a confirmação da oxidase negativa destas colónias faz-se uma subcultura para um tubo de Fluorocult que vai a incubar a 44°C durante 24 horas. Aqui verifica-se a fermentação da lactose pela acidificação do meio e conseqüente viragem da cor de roxo para amarelo, a fluorescência deste sob a luz UV e a produção de indol.

A produção de indol é verificada pela adição do reagente de Kovac's, pois alguns microrganismos têm a capacidade de clivar o triptofano presente no meio e formar um anel vermelho cereja.

Assim, contam-se as colónias que são oxidase negativa e lactose positiva como sendo coliformes totais, enquanto que as colónias oxidase negativas, lactose positivas, apresentadoras de fluorescência e/ou produção de indol são *E. coli*.

Durante os procedimentos de quantificação e enumeração de coliformes totais e *E. coli* deve-se ter em conta o controlo de qualidade referente aos meios de cultura utilizados, controlo analítico – ensaios em branco, controlo de temperatura da sala e, ainda se deve assegurar que todo o procedimento é efetuado em ambiente o mais asséptico possível.

Ao longo do procedimento é usado um controlo positivo – estirpe de *E. coli* e um controlo negativo – *Pseudomonas aeruginosa*, testando todos os meios e reagentes utilizados ^(3,5).

8.4. PESQUISA E QUANTIFICAÇÃO DE ESTAFILOCOCOS

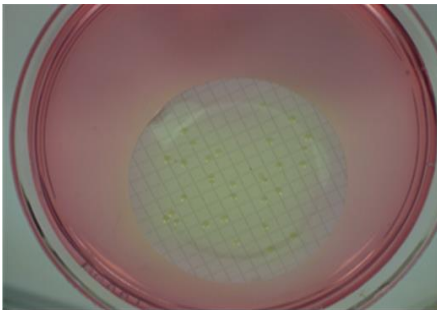


Ilustração 13 - Colónias suspeitas de *estafilococos* em meio de MSA

Fonte: ULS Guarda

Os *Staphylococcus* são cocos Gram positivos, com agrupamento em cacho, aeróbios e anaeróbios facultativos e produtores de catalase. Pertencem à família *Micrococcaceae* e uma das características a que se deve dar atenção é que podem ou não ser produtores de coagulase ^(3,5,10).

Os *Staphylococcus* produtores de coagulase – coagulase positiva, são bactérias que, para além das características anteriormente descritas, produzem enzimas capazes de coagular o plasma de certos animais. Um exemplo destas bactérias são os *Staphylococcus aureus*.

Os *Staphylococcus* são transmitidos pelas águas dos banhos, daí ser fundamental a sua pesquisa nas águas de piscinas e águas naturais.

As amostras de águas para fins recreativos são filtradas pelo método de membrana (com 0,45µm de porosidade), sendo esta posteriormente colocada em meio de MSA que vai a incubar a 37°C durante 48 horas.

Após a incubação observa-se o crescimento de colónias que se desenvolveram à superfície e contam-se os vários tipos de colónias suspeitas – brancas e amarelas, envolvidas ou não por um halo amarelo.

Repicam-se as colónias características para um meio não seletivo de WPCA que vai a incubar a 37°C durante 24 horas, sendo estas utilizadas para se fazerem os estudos confirmatórios.

Após a incubação destas colónias faz-se a coloração de Gram, onde se observa a morfologia. Os estafilococos apresentam-se na forma de cocos e agrupados em cachos. Quando as colónias apresentam estas características realizam-se os testes da catalase, determinação do tipo respiratório e pesquisa da coagulase ^(3,5).

Coloração de Gram

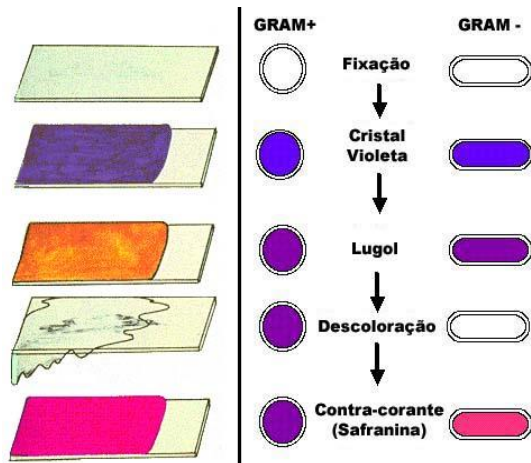


Ilustração 14 - Coloração de Gram

Fonte: www.google.pt

A coloração de Gram é uma coloração diferencial específica para bactérias.

O diferente comportamento das bactérias em relação à coloração deve-se ao facto de os dois grupos de bactérias apresentarem parede celular química e estrutural distintas ⁽²⁾.

As diferenças mais relevantes residem no facto de a parede celular das bactérias Gram positivos não apresentarem lípidos, enquanto que a parede celular das bactérias Gram negativos apresentam um alto teor destes e no facto de o peptidoglicano ser mais abundante nas

Gram positivos, representando cerca de 50 a 90% do peso total da parede celular, enquanto que nas Gram negativos apenas representam cerca de 10% do peso ⁽²⁾.

Estas diferenças vão ter repercussões na arquitetura da parede celular, sendo estas diferenças importantes para a coloração Gram.

Assim, o primeiro corante – violeta de cristal, cora todas as bactérias de roxo; o lugol vai fixar este corante nas células e o álcool – acetona vai destruir os lípidos das membranas formando “buracos” na parede celular das bactérias Gram negativos, ricas em lípidos, permitindo a saída do primeiro corante e a entrada do último corante, a safranina que lhes vai conferir uma cor avermelhada ⁽²⁾.

São estas diferenças na parede celular das bactérias que permitem que as bactérias Gram positivos corem de roxo e as Gram negativos se apresentem avermelhadas ⁽²⁾.

De seguida, apresenta-se o procedimento utilizado para a coloração de Gram ⁽⁵⁾.

1. Cobrir o esfregaço, já fixado à chama do bico de Bünsen, com solução de cristal de violeta durante 1 minuto;
2. Lavar com água corrente;

3. Cobrir com lugol e deixar atuar durante 1 minuto;
4. Lavar com água corrente;
5. Descorar com água – acetona até que não saia mais cor violeta do esfregão;
6. Lavar com água corrente;
7. Cobrir a superfície com solução de contra coloração – safranina durante 1 minuto;
8. Lavar com água corrente, deixar secar e observar ao microscópio.

Pesquisa catalase

Coloca-se uma gota da solução do reagente da catalase (solução de peróxido de hidrogénio a 3%) sobre uma lâmina, repica-se uma colónia suspeita e coloca-se em contacto com o reagente.

A catalase é uma enzima presente nas células dos microrganismos aeróbios. Esta cliva o peróxido de hidrogénio tóxico para a bactéria, produzindo água e oxigénio. A formação de bolhas de oxigénio indica a presença de colónias catalase positiva ^(3,5).

Determinação do tipo respiratório

O meio utilizado para fazer este estudo é o MEVAG. Antes da sua utilização deve proceder-se à sua regeneração. Os tubos devem ser mantidos a $45\pm 1^{\circ}\text{C}$ e a partir de uma colónia isolada, inocula-se o meio com a ajuda de uma ansa e com movimentos helicoidais de baixo para cima. O meio deve solidificar imediatamente e vai a incubar a 37°C durante 24 horas.

Como os estafilococos são aeróbios e anaeróbios facultativos verifica-se um crescimento difuso ao longo do tubo.

Este meio permite fazer a distinção entre o género *Staphylococcus* do género *Micrococcus*, pois os primeiros são bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas apresentam crescimento ao longo do tubo, enquanto que os segundos apresentam crescimento apenas à superfície do tubo (aeróbios estritos) ^(3,5).

Pesquisa da coagulase

Os *Staphylococcus aureus* são um microrganismo patogénico, sendo de extrema importância a sua deteção e distinção das outras espécies. Uma prova que permite fazer esta distinção é a produção de coagulase, sendo estes coagulase positiva.

Para a pesquisa da coagulase livre utiliza-se plasma de coelho, transferindo-se algumas colónias suspeitas para tubos pequenos que contêm o plasma e incuba-se a 37°C durante 24 horas. Os estafilococos produtores de coagulase formam um coágulo no tubo ^(3,5).

Na listagem de resultados deve-se fazer a distinção entre estafilococos produtores de coagulase e estafilococos não produtores de coagulase.

Durante os procedimentos deve-se realizar um controlo positivo e um controlo negativo. Como controlo positivo utiliza-se uma estirpe de *Staphylococcus aureus* e como controlo negativo utiliza-se uma estirpe de *estafilococos epidermidis* (teste da coagulase) e uma estirpe de *micrococos* (pesquisa do tipo respiratório) ^(3,5).

8.5. PEQUISA E QUANTIFICAÇÃO DE ENTEROCOCCUS

Os *enterococcus* funcionam como indicadores da poluição fecal antiga. São cocos Gram positivos que têm a capacidade de reduzir o cloreto de tetrazólio a formazona em meio específico de SB, não apresentam reação à catalase e hidrolisam a esculina em meio específico de BÍlis-esculina.

A pesquisa deste microrganismo é efetuada para todas as amostras de águas de piscinas e de águas termais.

A enumeração dos *enterococos* faz-se através da filtração da amostra por membrana de 0,45 µm de porosidade. A membrana é posteriormente colocada em meio específico de SB que contém azida sódica que impede o crescimento de bactérias Gram negativos e cloreto de tetrazólio (cloreto 2,3,5 – trifeniltetrazolium) incolor que é reduzido a formazona vermelha pelos *enterococos*.

As colónias típicas coram de vermelho castanho ou rosa após a incubação a 37°C durante 48 horas.

As colónias típicas são confirmadas após a transferência da membrana, com a face quadriculada voltada para baixo, para um meio pré aquecido de BÍlis-esculina que incuba a 44°C durante 2 horas.

Os *enterococos* hidrolisam a esculina do meio e o produto final 6,7 – dihidroxicumarina, quando combinada com os iões de ferro formam uma cor negra difusa no meio. A bÍlis presente no meio inibe o crescimento de outras bactérias.

Também aqui, as amostras devem ser acompanhadas por um controlo positivo – estirpe pura de *enterococos fecais* e um controlo negativo – *estafilococos aureus* ^(3,5).

8.6. PESQUISA E QUANTIFICAÇÃO DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA

As *pseudomonas* são um grupo de bactérias aeróbias Gram negativos, em forma de bastonete, direitos ou ligeiramente curvas. É um grupo muito heterogéneo que produz um pigmento verde amarelado e fluorescente sob radiação UV ^(3,5,10).

As *pseudomonas aeruginosa* é um organismo patogénico oportunista capaz de se desenvolver em meios com fracas concentrações de nutrientes. Esta desenvolve-se num meio seletivo de Pseudomonas CN que contem cetrimida. É um organismo oxidase positivo, produz fluorescência e é capaz de hidrolisar a caseína em meio de cetrimida com leite.

Este teste é feito para amostras de águas para fins recreativos e para águas termais. A membrana de 0,45µm de porosidade é colocada num meio seletivo e incubada a 37°C durante 24 e 48 horas. Contam-se como colónias suspeitas todas as colónias características sobre a membrana após a incubação.

As colónias características são produtoras de pigmentação verde azulado que podem ser confirmadas quando existem dúvidas, ou então, apresentam-se sem pigmentação mas com fluorescência ou castanho avermelhadas que necessitam sempre de confirmação.

A coloração verde azulada é dada pela produção de piocianina que é favorecida pelo cloreto de magnésio e sulfato de potássio, sendo a cetrimida um inibidor de outros microrganismos.

As colónias características são repicadas para um meio não seletivo de WPCA que incubada a 37°C durante 24 horas.

Às colónias que apresentam verde azulada, após repicagem, é feito o teste da oxidase, onde um resultado positivo indica a presença de *Pseudomonas aeruginosa*.

Às colónias sem pigmentação ou de cor castanho avermelhado, após a repicagem para meio não seletivo, faz-se os testes confirmatórios – teste da oxidase, produção de fluorescência e hidrólise da casease em meio seletivo de Skim Milk ^(3,5).

Confirmação de *Pseudomonas aeruginosa*

Como descrito anteriormente, as colónias que quando observadas sob luz UV produzem fluorescência, são produtoras de piocianina e são oxidase positiva são consideradas *P.aeruginosa*. As colónias castanho avermelhadas, sem pigmentação mas

com fluorescência, após teste de oxidase positiva, são repicadas para um meio de Skim Milk que incuba a 37°C durante 24 horas. Após a incubação verifica-se a hidrólise da caseína no meio (digestão ou coagulação da caseína do leite).

Colónias	Teste oxidase	Fluorescência	Hidrólise casease (Skim Milk)	Confirmação <i>P.aeruginosa</i>
Azuis esverdeadas	+	+	-----	Sim
Castanho/avermelhadas	+	+	+	Sim
Fluorescentes sem pigmentação	+	+	+	Sim

Tabela 2 - Confirmação de *Pseudomonas aeruginosa*

Para controlo da qualidade utiliza-se um controlo negativo – *E. coli* e um controlo positivo – estirpe de *P. aeruginosa*, para além dos testes em branco, controlo da temperatura e condições de assepsia ^(3,5).

CONCLUSÃO

Durante a realização deste estágio pude verificar a importância das atividades que um profissional de saúde, dentro do Laboratório de Saúde Pública desempenha, tendo como objetivo uma boa análise das amostras recebidas, com vista a uma melhor qualidade da água junto ao público em geral.

Uma boa análise das amostras é importante pois, resultados incorretos podem ter um forte impacto na economia e na saúde pública, onde resultados falso-positivos podem levar a medidas desnecessárias tais como encerramento dos locais de recreio e à divulgação de avisos como a fervura da água da rede de abastecimentos, que podem tornar-se medidas muito dispendiosas, e os falso-negativos podem expor a população a riscos diretos para a saúde pública devido ao consumo de águas inadequadamente tratadas ou nadar em águas poluídas.

Para mim, este estágio foi fundamental enquanto profissional de saúde e cidadã, uma vez que me permitiu ter bases importantes para avaliar determinadas situações que possam vir a ocorrer futuramente. Foi importante descobrir que os critérios para a avaliação de uma água não passam só pelas suas características organolépticas, existindo uma série de condições, como as análises físico-químicas (quantificação do cloro, do alumínio, o pH, entre outros) a que se deve estar atento e que nem todos os microrganismos presentes na água representam um risco para o consumo humano.

Outro aspeto que destaco é a importância da acreditação do Laboratório de Saúde Pública, uma vez que transmite uma maior confiança, por parte do utente, em relação aos resultados obtidos.

Uma vez que o Laboratório de Saúde Pública é acreditado, todos os procedimentos seguem uma ordem pré-definida, o que vai minimizar os riscos (tanto a nível do operador como da obtenção de resultados incorretos) durante a pesquisa e a quantificação de microrganismos nas amostras recebidas.

Neste estágio, tive a oportunidade de participar na pesquisa e quantificação de microrganismos o que me permitiu desenvolver as minhas capacidades dentro de um laboratório. Tive ainda a oportunidade de participar no controlo de qualidade interno do laboratório, nomeadamente ao nível do controlo das bancadas, do ar ambiente e das estufas de incubação.

Este estágio também contribuiu para a minha formação e permitiu-me adquirir novos conhecimentos, bem como consolidar conhecimentos teóricos adquiridos durante os períodos letivos.

BIBLIOGRAFIA

1. ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE DO INSTITUTO POLITÉCNICO DA GUARDA (2012/2013) – Regulamento Especifico Estágio Profissional I – Estágio de Integração à Vida Profissional. Guarda;
2. FERREIRA, W.F.C.; SOUSA, J.C.F. (1998) – *Microbiologia – volume I*; Lisboa; Lidel.
3. OLIVEIRA, J. F. S.; MENDES, B. (2004); *Qualidade da água para consumo humano*; Lisboa; Lidel.
4. LIGHTFOOT, N. F.; MAIER, E. A. (2003); *Análise microbiológica de alimentos e água*; Lisboa; Fundação Calouste Gulbenkian.
5. LABORATÓRIO DE SAÚDE PÚBLICA – ULS GUARDA (2013); *Procedimentos internos utilizados pelo laboratório*; Guarda.
6. Decreto-Lei nº 306/2007 de 27 de agosto. Diário da República – 1ª Série nº 164 (27-08-2007).
7. Decreto-Lei nº 243/2001 de 05 de setembro. Diário da República – 1ª Série nº 206 (05-09-2001).
8. Decreto-Lei nº 90/1990 de 16 de março. Diário da República – 1ª Série nº 63 (16-03-1990).
9. Decreto-Lei nº 142/2004 de 11 de junho. Diário da República – 1ª Série nº 136 (11-06-2004).
10. FERREIRA, W.F.C.; SOUSA, J.C.F. (1998) – *Microbiologia – volume II*; Lisboa; Lidel.