

CETESB	ESTREPTOCOCOS FECAIS - DETERMINAÇÃO EM AMOSTRAS DE ÁGUA PELA TÉCNICA DE MEMBRANA FILTRANTE Método de ensaio	L5.211 DEZ/92
--------	---	----------------------

SUMÁRIO	Pág.
Introdução.....	1
1 Objetivo.....	3
2 Normas e documento complementares.....	3
3 Definições.....	3
4 Aparelhagem.....	5
5 Meios de cultura e soluções.....	10
6 Execução do ensaio.....	15
7 Resultados.....	24
Anexo A - Testes bioquímicos para identificação de estrepto cocos fecais.....	29
Anexo B - Recomendações de ordem geral.....	31
Anexo C - Referências bibliográficas.....	35

INTRODUÇÃO

Os estreptococos fecais constituem um grupo de bactérias, cujo hábitat normal é o trato intestinal humano e de outros animais de sangue quente; estas bactérias normalmente não ocorrem em águas e solos de áreas não poluídas, sendo que as poucas incidências estão relacionadas diretamente a animais de vida selvagem ou à drenagem dos solos por enxurradas. Embora estas bactérias possam persistir por longos períodos em águas de irrigação com alto teor eletrolítico, geralmente não se multiplicam em águas poluídas, sendo sua presença, portanto, indicativa de contaminação fecal recente.

Embora o reconhecimento dos estreptococos fecais como indicadores de contaminação fecal remonte ao início do século, este grupo de bactérias não teve uma aplicação mais generalizada para essa finalidade basicamente por duas razões. Em primeiro lugar, as bactérias do grupo coliforme já vinham sendo amplamente utilizadas como indicadores, considerando-se ser mais fácil a sua enumeração e também por estarem presentes em maior quantidade nas fezes, esgotos e águas poluídas. Em segundo lugar, havia alguma confusão quanto à identidade dos estreptococos fecais, particularmente no que se referia à sua distribuição ecológica, sendo que os estreptococos, que podem ser encontrados nas fezes humanas e de outros animais de sangue quente, eram referidos

ora como enterococos, ora como estreptococos fecais e, mais recentemente, como estreptococos do grupo D.

Atualmente, são as seguintes as espécies que compõem o grupo dos estreptococos fecais: Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Enterococcus avium, Enterococcus gallinarum (sub-grupo dos enterococos) além de Streptococcus bovis e Streptococcus equinus.

As espécies incluídas no grupo dos estreptococos fecais apresentam diferentes graus de resistência às condições ambientais. Assim, as espécies componentes do sub-grupo dos enterococos apresentam maior resistência e os critérios utilizados para sua caracterização incluem sua capacidade de crescimento tanto a 10°C como a 45°C e sobrevivência a 60°C durante, no mínimo, 30 minutos. Seu crescimento pode ocorrer também em pH = 9,6 e na presença de cloreto de sódio na concentração de 6,5%. Esses organismos são também capazes de reduzir azul de metileno em leite. As características bioquímicas de E.avium são semelhantes às de E.faecium, sendo a distinção entre os mesmos baseada na inabilidade de crescimento de E.avium em leite com azul de metileno. Por outro lado, S.bovis e S.equinus são mais sensíveis que qualquer outro tipo de bactérias indicadoras de poluição fecal, resistindo somente cerca de 24 horas na água; estas bactérias não crescem a 10°C, nem na presença de cloreto de sódio a 6,5%, nem em pH = 9,6 ou em leite com azul de metileno. Dentro do grupo dos estreptococos fecais encontram-se alguns biotipos de limitada significação sanitária, os quais não são restritos ao intestino do homem e de outros animais de sangue quente, podendo ocorrer associados à vegetação e a certos tipos de solos.

Os enterococos constituem um sub-grupo dos estreptococos fecais, no qual são incluídas as seguintes espécies: E.faecalis, E.faecium, E.gallinarum e E.avium, as quais são diferenciadas dos outros estreptococos fecais pela sua habilidade de crescer em pH = 9,6; em 6,5% de cloreto de sódio e às temperaturas de 10 e 45°C.

Os enterococos têm demonstrado ser um excelente indicador bacteriológico para determinar o grau de contaminação fecal em águas recreacionais. Estudos realizados em praias de águas marinhas e doces têm evidenciado que as gastroenterites associadas à natação estão relacionadas diretamente ao grau de contaminação dessas águas e que os enterococos são os indicadores bacteriológicos mais eficientes para a caracterização da qualidade das mesmas.

1 OBJETIVO

Esta Norma prescreve a técnica de membrana filtrante, utilizada na determinação de estreptococos fecais (com diferenciação para enteroccos), com aplicação na:

- . avaliação da qualidade de águas de novas fontes de abastecimento.
- . confirmação da origem fecal da contaminação, quando são obtidos resultados duvidosos no teste para coliformes, em águas destinadas a consumo humano.
- . avaliação da qualidade de águas subterrâneas.
- . avaliação da qualidade de águas minerais.
- . avaliação da qualidade de águas recreacionais, inclusive águas marinhas.
- . avaliação da eficiência de processos de tratamento de esgoto, na remoção de microrganismos.

2 NORMAS E DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

Na aplicação desta Norma é necessário consultar:

- L5.215 - Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos.
- L5.216 - Controle de qualidade de meios de cultura.
- M1.001 - Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratório de microbiologia.
- Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água, da CETESB.

3 DEFINIÇÕES

3.1 Estreptococos fecais

O grupo de estreptococos fecais engloba todas as espécies de estreptococos que ocorrem em grandes quantidades em fezes humanas e de outros animais de sangue quente, apresentando, assim, importância na avaliação da qualidade sanitária de águas e esgotos. São as seguintes espécies que o compõem:

Estreptococos fecais	<u>Enterococcus faecalis</u>	} sub-grupo dos enterococos
	<u>Enterococcus faecium</u>	
	<u>Enterococcus avium</u>	
	<u>Enterococcus gallinarum</u>	
	<u>Streptococcus bovis</u>	
	<u>Streptococcus equinus</u>	

Todas estas espécies pertencem ao grupo D de Lancefield. Além disso, E. avium pode reagir com o antisoro do grupo Q de Lancefield.

Estas bactérias são cocos Gram-positivos, geralmente ocorrendo aos pares ou em cadeias curtas, e apresentam reação negativa na prova de catalase. As características básicas, que confirmam sua presença, incluem a capacidade destes organismos de hidrolizar a esculina e de crescer, tanto à temperatura de 45°C, como na presença de sais biliares na concentração de 40%.

3.2 Coco

Designação dada às bactérias que apresentam forma esférica.

3.3 Coloração de Gram

Coloração diferencial, através da qual as bactérias são classificadas em Gram-positivas ou Gram-negativas, dependendo da retenção ou não do corante cristal-violeta.

3.4 Catalase

Enzima que cataliza a reação em que atuam duas moléculas de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), uma como doadora e outra como receptora de hidrogênio. Sua presença na bactéria, ao ser adicionado o peróxido de hidrogênio sobre uma suspensão da cultura, é evidenciada pela liberação de oxigênio (O₂), havendo formação de bolhas de gás.



3.5 Ágar M-Enterococos

Meio seletivo para isolamento de estreptococos fecais, no qual a fermentação da glicose é evidenciada pela coloração rosa a vermelho-escura das colônias, devida ao indicador cloreto de 2, 3, 5 trifeniltetrazólio. A azida sódica, presente no meio, inibe o crescimento de bactérias Gram-negativas, devido à inibição do sistema citocromo bacteriano e redução da atividade da catalase.

3.6 Ágar Bile Esculina

Meio seletivo e diferencial, no qual as bactérias Gram-negativas são inibidas pela azida sódica e as Gram-positivas, excetuando-se os estreptococos fecais, são inibidas pelos sais biliares. Nesse meio, os estreptococos fecais, através de suas enzimas e na presença de água, hidrolizam a esculina, havendo a formação de esculetina (6, 7 di-hidroxycumarina), a qual reage com o íon férrico, havendo a for

mação de um complexo castanho-enegecido, difusível no meio.

4 APARELHAGEM

4.1 Equipamentos

4.1.1 Balança

Com sensibilidade de, no mínimo, 0,1 g ao serem pesados 150 g.¹

4.1.2 Banho-maria

Equipado com termostato e agitador de baixa velocidade, para promover a circulação da água e manter a temperatura uniforme ($45 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) em todos os pontos². A quantidade de água no banho-maria deve ser suficiente para atingir a altura do nível do meio contido no tubo, sendo recomendada a troca semanal dessa água, para evitar a proliferação de fungos e/ou outros microrganismos.

4.1.3 Destilador de água ou aparelho para desionização

Deve produzir água não tóxica, livre de substâncias que impeçam ou interfiram na multiplicação bacteriana, cuja condutividade deve ser inferior a $2 \mu\text{S}/\text{cm}$ a 25°C e o pH estar na faixa de 5,5 a 7,5.

Nota: A densidade de bactérias heterotróficas na água recém-destilada deve ser inferior a 1 000 unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) e a 10 000 UFC/mL na água destilada armazenada, devendo esse controle ser efetuado com frequência mínima mensal.

4.1.4 Equipamentos para esterilização

4.1.4.1 Autoclave

É normalmente operada a uma pressão de 103 393 Pa ($1,05 \text{ kgf}/\text{cm}^2$ ou $15 \text{ lb}/\text{pol}^2$), produzindo, em seu interior, uma temperatura de $121,6^{\circ}\text{C}$ ao nível do mar. Em seu funcionamento, deve-se observar a substituição por vapor de todo o ar existente na câmara e sua operação completa deve durar, no máximo, uma hora, sendo recomendável que a temperatura de esterilização seja atingida em até 30 minutos.

1. As balanças devem ser colocadas em local adequado, protegidas de vibrações, umidade e mudanças bruscas de temperatura; devem ser mantidas limpas e manuseadas por pessoal que conheça seu funcionamento. Sua aferição deve ser feita periodicamente.
2. Devem ser feitos registros contínuos ou periódicos da temperatura e os termômetros usados devem ser graduados com intervalos de escala de $0,1^{\circ}\text{C}$.

4.1.4.2 Estufa para esterilização

Deve manter a temperatura de $(170 \pm 10^{\circ}\text{C})$ durante o período de esterilização (mínimo de duas horas).

4.1.4.3 Lâmpadas germicidas (ultra-violeta)

São usadas na descontaminação dos porta-filtros, entre as sucessivas séries de filtrações e para esterilização das placas de Petri de plástico não autoclavável, usadas na técnica de membrana filtrante.³

4.1.5 Equipamentos para filtração

4.1.5.1 Bomba de vácuo ou outro dispositivo conveniente para produzir uma pressão diferencial no porta-filtro de, no mínimo, 0,5 atm.

4.1.5.2 Frasco Kitasato de paredes espessas, para filtração, com capacidade adequada (usualmente 4 L), ou suporte especial para os porta-filtros.

4.1.5.3 Frasco Kitasato para proteção da fonte de vácuo, com capacidade adequada (usualmente 1L), conectado ao frasco de filtração (ou ao suporte especial) e à fonte de vácuo através de tubo de polietileno ou de látex de espessura adequada.

4.1.5.4 Porta-filtro de vidro, plástico autoclavável ou aço inoxidável (ver Figura 1).

4.1.6 Incubadora bacteriológica termostaticada

Deve manter a temperatura na faixa de $(35 \pm 0,5^{\circ}\text{C})$ e a umidade relativa entre 75 e 85% e ser colocada em um local onde a temperatura permaneça na faixa de 16 a 27°C.⁴

4.1.7 Medidor de pH

Deve fornecer exatidão mínima de 0,1 unidade de pH e sua calibração deve ser feita pelo menos duas vezes ao dia com, no mínimo, duas soluções-tampão padrões (pH = 4,0; pH = 6,86 ou pH = 9,18).

3. A exposição a microondas é um processo alternativo para esterilização dessas placas (Ver Norma Técnica CETESB M1.001 - Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratórios de microbiologia).

4. A verificação da temperatura da incubadora deve ser feita periodicamente (mínimo de 2 vezes ao dia) através de termômetros (com o bulbo submerso em água, glicerina ou óleo mineral) colocados em pontos representativos da mesma, sendo aconselhável também a colocação de um termômetro de máxima e mínima em sua parte central. A estratificação da temperatura na incubadora pode ser evitada através da colocação, em seu interior, de um dispositivo para circulação do ar.

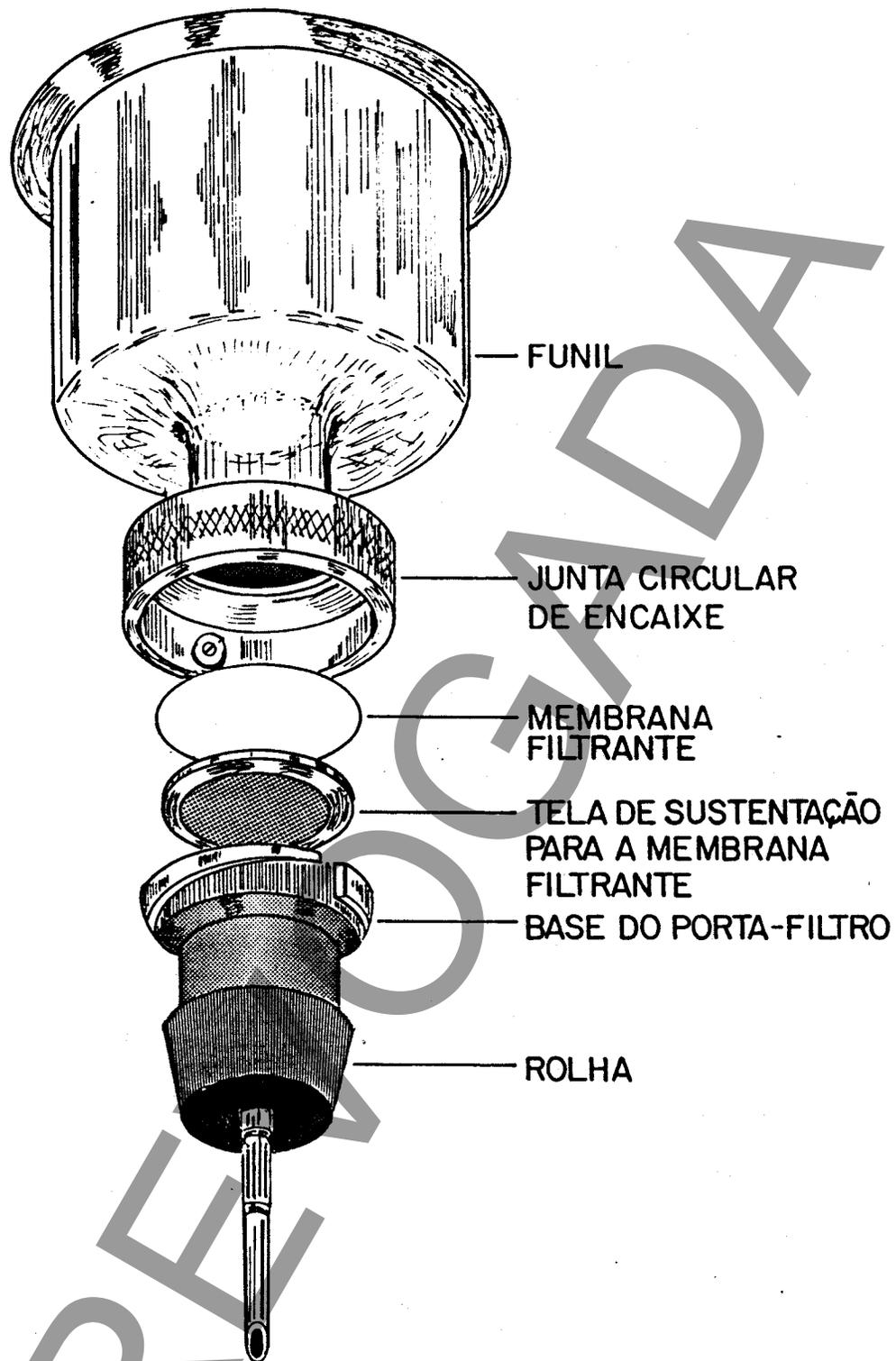


FIGURA 1 - Vista geral dos diversos componentes da unidade de filtração

4.1.8 Microscópio estereoscópico binocular

Para ampliação de 10 a 15 diâmetros.

Nota: Para iluminação, usar lâmpada de luz fluorescente branca (fria).

4.1.9 Refrigerador

Deve manter a temperatura na faixa de 2 a 10°C.

4.2 Vidraria

4.2.1 Balões

De borossilicato ou de vidro neutro, com capacidade adequada para conter a água de diluição tamponada a ser usada no enxágue dos porta-filtros, durante a filtração das amostras.

4.2.2 Frasco para coleta de amostra

De vidro neutro ou plástico autoclavável atóxico, com capacidade mínima de 125 mL, boca larga e tampa à prova de vazamento.

4.2.3 Provetas

Graduadas (100 mL) ou porta-filtros graduados com marcação externa.

4.2.4 Tubos de ensaio

De borossilicato ou vidro neutro de 12 x 120 mm.

4.2.5 Frasco para água de diluição

De borossilicato ou vidro neutro, com tampa de rosca que permita boa vedação e seja livre de substâncias tóxicas solúveis, com capacidade para conter 90 ± 2 mL de água de diluição tamponada, deixando um espaço suficiente para permitir uma boa homogeneização quando se efetuar a agitação.

4.2.6 Pipetas

Devem ser de borossilicato, tipo Mohr, para 10 mL, 5 mL e 1 mL, com graduação de 1/10 e erro de calibração inferior a 2,5%, com bocal para tampão de algodão.

4.2.7 Placas de Petri

De borossilicato ou vidro neutro, com 15 mm de altura e 100 mm de diâmetro.

4.3 Outros materiais

4.3.1 Alças de inoculação

Fio de níquel-cromo, platina-irídio ou platina, com 0,5 mm de diâmetro e 7 a 8 cm de comprimento, com um aro de 3 mm de diâmetro numa das extremidades, sendo a outra fixada a um cabo metálico (cabo de Kolle).⁵

4.3.2 Bandejas de plástico ou aço inoxidável

Devem ser forradas com material absorvente embebido em água, para fornecer a umidade requerida durante a incubação das placas de Petri contendo as membranas após a filtração das amostras.

4.3.3 Bicos de Bunsen ou similar

Devem ter funcionamento adequado de modo a produzir combustão completa.

4.3.4 Caixas ou cestas de aço inoxidável

Para acondicionamento de materiais a serem esterilizados.

4.3.5 Estantes

De aço inoxidável ou galvanizado plastificado, de tamanho adequado para acomodação dos tubos de ensaio.

4.3.6 Estojo para pipetas

Usar estojos de alumínio ou aço inoxidável de tamanho adequado para acondicionamento das pipetas a serem esterilizadas. Opcionalmente, as mesmas podem ser embrulhadas individualmente em papel Kraft para esterilização.

4.3.7 Membranas filtrantes

Com 47 mm de diâmetro e 0,45 µm de porosidade, brancas, quadriculadas, estéreis.

4.3.8 Pinças

De aço inoxidável, com as extremidades arredondadas.

4.3.9 Placas de Petri

De plástico não tóxico, bem vedadas, de 48 mm de diâmetro x 8,5 mm de altura.

4.3.10 Recipientes para preparação de meios de cultura

Devem ser de vidro ou aço inoxidável, limpos e isentos de qualquer substância tóxica (nunca devem ser de cobre).

5. Opcionalmente ao uso de alças de inoculação, podem ser empregadas hastes de madeira de aproximadamente 20 cm de comprimento por 0,2 cm de diâmetro. Antes do uso, essas hastes são esterilizadas por calor seco (170 a 180°C) durante três horas e, após o uso, devem ser autoclavadas a 121°C durante 15 minutos e descartadas.

4.3.11 Tela de amianto4.3.12 Tripé4.3.13 Termômetros5 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

Nota: Para o preparo dos meios de cultura devem ser usados, preferencialmente, meios desidratados de qualidade comprovada. Pode-se, no entanto, prepará-los em laboratório a partir de seus componentes específicos, devendo ser utilizadas, para essa finalidade, substâncias com alto grau de pureza (p.a.).

5.1 Ágar M-Enterococos5.1.1 Fórmula:

Triptose.....	20,0 g
Extrato de levedura.....	5,0 g
Glicose.....	2,0 g
Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) p.a.....	4,0 g
Azida sódica (NaN_3) p.a.....	0,4 g
Cloreto de 2, 3, 5 trifeniltetrazólio.....	0,1 g
Ágar.....	10,0 g
Água destilada.....	1 000 mL
pH final após esterilização: $7,2 \pm 0,2$ a $25^\circ C$	

5.1.2 Preparo

Pesar 42,0 g do meio desidratado Ágar M-Enterococos e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Deixar em repouso durante, aproximadamente, quinze minutos. Aquecer em banho-maria. Após a dissolução, colocar o meio em banho-maria a $44-46^\circ C$, para estabilização da temperatura e, a seguir, distribuir asépticamente volumes de aproximadamente 4 a 6 mL em placas de Petri de 48 mm x 8,5 mm, previamente esterilizadas.

5.1.3 Armazenamento

O meio preparado poderá ser estocado ao abrigo da luz e à temperatura de 2 a $8^\circ C$ durante, no máximo, 30 dias.

5.2 Caldo infusão de cérebro e coração5.2.1 Fórmula:

Infusão de cérebro de vitela.....	200,0 g
Infusão de coração.....	250,0 g
Proteose peptona.....	10,0 g

Glicose.....	2,0 g
Cloreto de sódio (NaCl) p.a.....	5,0 g
Fosfato de sódio dibásico (Na ₂ HPO ₄) p.a.....	2,5 g
Água destilada.....	1 000 mL
pH final após esterilização: 7,4 ± 0,2 a 25°C	

5.2.2 Preparo

Pesar 37,0 g do meio desidratado caldo infusão de cérebro e coração e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Em tubos de ensaio de 12 mm x 120 mm, distribuir volumes adequados para que o volume final, após esterilização, seja de 5 mL. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

5.2.3 Armazenamento

O meio preparado poderá ser estocado à temperatura ambiente, em local limpo e livre de poeira, durante, no máximo, uma semana.

5.3 Ágar infusão de cérebro e coração

5.3.1 Fórmula

Infusão de cérebro de vitela.....	200,0 g
Infusão de coração.....	250,0 g
Proteose peptona.....	10,0 g
Glicose.....	2,0 g
Cloreto de sódio (NaCl) p.a.....	5,0 g
Fosfato de sódio dibásico (Na ₂ HPO ₄) p.a.....	2,5 g
Ágar.....	15,0 g
Água destilada.....	1 000 mL
pH final após esterilização: 7,4 ± 0,2 a 25°C	

5.3.2 Preparo

Pesar 52,0 g do meio desidratado ágar infusão de cérebro e coração e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria, deixando em repouso durante, aproximadamente, 15 minutos. Aquecer em banho-maria, agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Após a dissolução, tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. A seguir, estabilizar a temperatura do meio a 44-46°C em banho maria e distribuir, assepticamente, volumes de 12 a 15 mL do meio em placas de Petri de 15 x 150 mm.

5.3.3 Armazenamento

O meio preparado poderá ser estocado à temperatura ambiente, em local limpo e livre de poeira, durante, no máximo, uma semana.

5.4 Ágar Bile Esculina

5.4.1 Fórmula:

Extrato de carne.....	3,0 g
Peptona.....	5,0 g
Bile de boi desidratada.....	40,0 g
Esculina.....	1,0 g
Citrato férrico.....	0,5 g
Ágar.....	15,0 g
Água destilada.....	1 000 mL
pH final após esterilização: $6,6 \pm 0,2$ a 25°C	

5.4.2 Preparo

Pesar 64,5 g do meio desidratado Ágar Bile Esculina e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria, deixando em repouso durante, aproximadamente, 15 minutos. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos. Evitar aquecimento excessivo, pois isto pode causar escurecimento do meio. Após a autoclavação, estabilizar a temperatura do meio a $44-46^{\circ}\text{C}$ em banho-maria e, com todos os cuidados de assepsia, distribuir volumes de, aproximadamente, 15 mL em placas de Petri de 15 mm de altura por 100 mm de diâmetro.

5.4.3 Armazenamento

O meio preparado poderá ser estocado ao abrigo da luz e à temperatura de 4 a 10°C , durante, no máximo, uma semana.

5.5 Caldo infusão de cérebro e coração com 6,5% de cloreto de sódio

5.5.1 Fórmula:

Infusão de cérebro de vitela.....	200,0 g
Infusão de coração.....	250,0 g
Proteose peptona.....	10,0 g
Glicose.....	2,0 g
Cloreto de sódio (NaCl) p.a.....	65,0 g
Fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) p.a.....	2,5 g
Água destilada.....	1 000 mL
pH final após esterilização: $7,4 \pm 0,2$ a 25°C	

5.5.2 Preparo

Pesar 37,0 g do meio desidratado caldo infusão de cérebro e coração e acrescentar 60 g de cloreto de sódio. Adicionar 1 000 mL de água destilada fria. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Em tubos de ensaio de 12 x 120 mm, distribuir volumes adequados para que o volume final, após esterilização, seja de 5 mL. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

5.5.3 Armazenamento

O meio preparado poderá ser estocado à temperatura ambiente, em local limpo e livre de poeira, durante, no máximo, uma semana.

5.6 Água de diluição5.6.1 Fórmula:

Solução estoque A.....	1,25 mL
Solução estoque B.....	5,00 mL
Água destilada.....	1 000 mL

5.6.2 Preparo

a) preparar a solução estoque A com a seguinte composição:

Fosfato monopotássico (KH_2PO_4) p.a....	34,0 g
Água destilada q.s.p.....	1 000 mL

Preparo: Dissolver o fosfato monopotássico em 500 mL de água destilada. Ajustar o pH para $7,2 \pm 0,5$ com solução de hidróxido de sódio 1N e completar o volume para 1 litro com água destilada. Distribuir volumes adequados à necessidade de uso do laboratório, em frascos com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Armazenar em geladeira⁶.

b) preparar a solução estoque B com a seguinte composição:

Cloreto de magnésio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).....	81,1 g
Água destilada q.s.p.....	1 000 mL

Preparo: Dissolver o cloreto de magnésio em 500 mL de água destilada e completar o volume para 1 000 mL com água destilada. Distribuir volumes adequados à necessidade de uso

6. Antes da utilização da solução estoque A, deve-se verificar se não há quaisquer evidências de contaminação microbiana (turbidez, presença de material em suspensão). Em caso afirmativo, essa solução deve ser descartada.

do laboratório em frascos com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Armazenar em geladeira.

- c) adicionar 1,25 mL da solução estoque A e 5 mL da solução estoque B a um litro de água destilada;
- d) distribuir quantidades que assegurem, após autoclavação, volumes de 90 ± 2 mL em frascos com tampa de rosca; e
- e) tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

5.7 Solução de peróxido de hidrogênio a 3%

5.7.1 Fórmula:

Peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) p.a.....	3 mL
Água destilada q.s.p.....	100 mL

5.7.2 Preparo:

Colocar 3 mL de peróxido de hidrogênio em um balão volumétrico e completar o volume para 100 mL com água destilada. Misturar bem através de agitação.

5.8 Solução de hidróxido de sódio 1N

5.8.1 Fórmula:

Hidróxido de sódio (NaOH) p.a.....	40,0 g
Água recém-destilada q.s.p.....	1 000 mL

5.8.2 Preparo:

Pesar 40,0 g de hidróxido de sódio, colocar em um balão volumétrico e completar o volume para 1 000 mL com água recém-destilada. Homogeneizar bem até a completa dissolução do hidróxido de sódio. Armazenar em frasco com tampa de rosca.

5.9 Soluções para a coloração de Gram

5.9.1 Solução de cristal violeta

Preparo:

Dissolver 2 g de cristal violeta em 20 mL de álcool etílico a 95% e filtrar em papel grosso ou algodão. Dissolver 0,8 g de oxalato de amônia em 80 mL de água destilada. Misturar estas soluções em partes iguais, 24 horas antes do uso, filtrando através de papel de filtro.

7. A água de diluição a ser utilizada não enxagüe de porta-filtros após a filtração de cada amostra, pode ser distribuída em balões, em volumes adequados às necessidades de uso do laboratório, devendo ser observado o tempo requerido para a esterilização por autoclavação do volume utilizado (30 minutos para volumes de 500 a 1 000 mL).

5.9.2 Solução de lugol

Preparo:

Dissolver 2 g de iodeto de potássio (KI) em 5 mL de água destilada. Adicionar 1 g de cristais de iodo à solução de iodeto de potássio e agitá-lo até que se dissolva. Adicionar água destilada até completar o volume de 300 mL.

5.9.3 Solução de safranina

Preparo:

Dissolver 2,5 g de safranina em 100 mL de álcool etílico a 95% (p.a.) preparando-se, assim, a solução estoque de safranina. No momento do uso, diluir 10 mL dessa solução estoque em 100 mL de água destilada.

5.9.4 Solução de álcool-acetona

Preparo:

Misturar álcool etílico a 95% (p.a.) e acetona em partes iguais.

6 EXECUÇÃO DO ENSAIO

6.1 Princípio do método

A técnica de membrana filtrante baseia-se na filtração de volumes adequados de água, mediante pressão negativa (vácuo), através de membrana filtrante, com porosidade de 0,45 μm . As bactérias a serem detectadas, apresentando dimensões maiores, ficarão retidas na superfície da membrana, a qual será então transferida para uma placa de Petri, contendo o meio de cultura seletivo e diferencial. Por capilaridade, o meio se difundirá para a membrana, entrando em contato com as bactérias e, após um período determinado de incubação, se desenvolverão colônias com características típicas, que poderão ser observadas com auxílio de um microscópio estereoscópico. A partir da contagem destas colônias, calcula-se a densidade de bactérias presentes na amostra.

6.2 Amostragem

Deve ser efetuada segundo as especificações apresentadas no Guia de Coleta e Preservação de amostras de Água da CETESB.

6.3 Desenvolvimento do ensaio

6.3.1 Identificar a amostra a ser analisada e definir os volumes a serem filtrados em função de sua procedência, segundo especificado a seguir:

- a) para águas destinadas a consumo humano, é recomendada a análise de um volume mínimo de 100 mL da amostra, o qual é filtrado di

retamente, no caso de águas tratadas. Para águas brutas (poços, fontes, nascentes) ou águas com tratamento inadequado, pode ser requerida a subdivisão desse volume em quantidades menores: 2 de 50 mL; 4 de 25 mL; 70, 25 e 5 mL, etc.;

- b) para águas superficiais marinhas ou doces, pode ser requerida a filtração de volumes menores (diluições decimais da amostra).

6.3.2 Antes de iniciar o exame, desinfetar a bancada de trabalho, usando um desinfetante que não deixe resíduos.

6.3.3 Dispondo sobre a mesma o seguinte material:

- a) porta-filtro(s) previamente esterilizado(s), adaptado(s) ao frasco de filtração (ou a um suporte especial), o qual é conectado a um frasco Kitasato de segurança e este, à fonte de vácuo;
- b) placas de Petri, contendo o meio ágar M-Enterococos, identificadas com os números das amostras que deverão conter;
- c) pinça com as extremidades mergulhadas em álcool etílico;
- d) bicos de Bunsen, para manter o ambiente asséptico e efetuar a flambagem das pinças utilizadas;
- e) provetas graduadas estéreis, com a abertura recoberta com papel alumínio, identificadas com os números das amostras, no caso de não se dispor de porta-filtros graduados com marcação externa;
- f) água de diluição tamponada estéril, contida em balões volumétricos identificados com o número dos porta-filtros, para cujo enxágüe serão utilizados; e
- g) membranas filtrantes estéreis, com 47 mm de diâmetro, porosidade de 0,45 μm , brancas, quadriculadas.

6.3.4 Preparação do porta-filtro:

- a) retirar a parte superior do porta-filtro e, com as extremidades de uma pinça flambada e resfriada, colocar uma membrana filtrante estéril, com a face quadriculada voltada para cima, centralizando-a sobre a parte inferior do porta-filtro; e
- b) acoplar a parte superior do porta-filtro à parte inferior, tomando cuidado para não danificar a membrana.

6.3.5 Preparação da amostra para a filtração

6.3.5.1 Para volumes iguais ou superiores a 20 mL:

- a) homogeneizar a amostra, por agitação manual, inclinando o frasco (formando um ângulo de aproximadamente 45° entre o braço e o antebraço) e agitando vigorosamente; repetir a operação no mínimo 25 vezes; e
- b) distribuir os volumes requeridos da amostra em provetas estéreis e efetuar a filtração como em 6.3.6 a 6.3.11.

6.3.5.2 Para volumes inferiores a 20 mL:

- a) adicionar ao porta-filtro 20 a 30 mL de água de diluição tamponada estéril (não é necessário medir o volume, pois este servirá apenas de suporte para que as possíveis bactérias existentes na amostra se distribuam uniformemente na superfície da membrana, ao ser efetuada a filtração); e
- b) homogeneizar a amostra (como em 6.3.5.1-a) e, com auxílio de uma pipeta estéril, retirar o volume desejado e efetuar a filtração como em 6.3.6 a 6.3.11.

6.3.5.3 Para volumes decimais (diluições da amostra):

- a) preparar as diluições decimais da amostra da seguinte forma:
 - . efetuar a marcação de cada frasco de água de diluição estéril, anotando o número da amostra e a diluição que deverá conter;
 - . homogeneizar a amostra (como em 6.3.5.1-a) e, com uma pipeta estéril de 10 mL e obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir 10 mL da amostra para um frasco previamente identificado, contendo 90 ± 2 mL de água de diluição estéril. Estará preparada assim a primeira diluição decimal (10^{-1}), sendo que 1 mL da mesma corresponde ao volume de 0,1 mL da amostra;
 - . repetir a operação segundo o item anterior, com o frasco contendo a diluição feita anteriormente (10^{-1}) e desta, com uma nova pipeta estéril de 10 mL, transferir 10 mL para um novo frasco, previamente identificado, contendo 90 ± 2 mL de água de diluição estéril. Prepara-se assim a segunda diluição decimal (10^{-2}), sendo que 1 mL da mesma corresponde ao volume de 0,01 mL da amostra;
 - . proceder dessa maneira na seqüência das diluições desejadas (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-8} ,); e

- b) após o preparo das diluições, preparar o porta-filtro como descrito em 6.3.4 e, após homogeneização da diluição selecionada para a filtração (conforme 6.3.5.1-a), retirar o volume desejado com uma pipeta estéril e realizar a filtração como em 6.3.6 a 6.3.11.

6.3.6 Verter cuidadosamente o volume da amostra a ser examinada no porta-filtro, evitando que a água respingue sobre as bordas superiores do mesmo.

6.3.7 Ligar a bomba de vácuo e efetuar a filtração.

6.3.8 Após a filtração, enxaguar o porta-filtro duas vezes com porções de 20-30 mL de água de diluição tamponada estéril, para evitar a retenção de alguma bactéria nas paredes internas do mesmo.

6.3.9 Desligar a fonte de vácuo, ao finalizar a operação. Evitar a secagem excessiva da membrana filtrante.

6.3.10 Separar a parte superior do porta-filtro e, com uma pinça, cujas extremidades foram flambadas e resfriadas, retirar, com cuidado, a membrana. Acoplar novamente a parte superior do porta-filtro à inferior.

6.3.11 Obedecendo aos cuidados de assepsia, colocar cuidadosamente a membrana, com a superfície quadriculada voltada para cima, na superfície do meio de cultura contido na placa de Petri, devidamente identificada com o número da amostra e o volume filtrado.

Nota: Ao transferir a membrana para a superfície do meio de cultura, observar que toda a área da membrana deve ficar completamente aderida ao meio. Para isso, segurando a membrana pelas bordas (fora da área de filtração) com as extremidades da pinça, previamente flambadas e resfriadas, colocá-la sobre o meio de cultura e efetuar um movimento giratório da mesma, para permitir uma boa adesão. Se persistir a formação de bolhas entre a membrana e o meio de cultura, sempre com a extremidade da pinça, levantar a borda da membrana mais próxima à bolha para eliminá-la, pois as bolhas impedem o contato das bactérias com o meio de cultura, dificultando, ou mesmo impedindo seu crescimento.

6.3.12 Tampar a placa de Petri.

6.3.13 Lavar novamente o porta-filtro com água de diluição estéril,

segundo item 6.3.8 e efetuar a filtração da próxima amostra.⁸

6.3.14 Após as filtrações, manter as placas à temperatura ambiente durante 30 minutos. A seguir, colocá-las em posição invertida em ba^{de}jas em cujo fundo foram colocadas folhas de papel-toalha (ou outro material absorvente) embebidas em água.

6.3.15 Efetuar a incubação das placas a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas.

6.3.16 Após o período de incubação e com auxílio de um microscópio estereoscópico, com iluminação fluorescente, efetuar a contagem das colônias típicas de estreptococos fecais (com coloração variando do rosa ao vermelho escuro), considerando as seguintes observações:

6.3.16.1 Os limites aceitáveis para a contagem se situam entre 20 e 60 colônias típicas.

6.3.16.2 No caso de terem sido filtrados vários volumes, selecionar, para leitura, apenas aquele(s) que tiver(em) fornecido(s) contagem(s) dentro dos limites aceitáveis.

6.3.16.3 Nos casos em que todos os volumes filtrados fornecerem con^{ta}tagens superiores a 60, mas for possível efetuar a contagem no menor desses volumes, observar o exposto no item 7.2.3 para a expressão dos resultados.

6.3.16.4 Se a contagem em todos os volumes filtrados for inferior a 20 colônias típicas, não considerar o limite mínimo e efetuar a lei^{tu}ra em todas as placas correspondentes aos volumes filtrados da amos^{tra}. Considerar a nota do item 7.1.1, para o cálculo dos resultados.

6.3.16.5 Quando todos os volumes filtrados apresentarem con^{ta}tagens iguais a zero, expressar os resultados segundo item 7.2.5.

6.3.16.6 Quando a estimativa visual do total de colônias for supe^{ri}or a 200, ou quando houver crescimento em toda a área de filtração da membrana, sem colônias bem definidas (crescimento confluyente), a contagem não é efetuada, sendo os resultados relatados conforme item 7.2.2.

8. Os porta-filtros devem estar estéreis no início de cada série de filtrações e, se houver um inter^{va}lo de 30 minutos entre uma filtração e outra, os mesmos devem ser esterilizados novamente, para evitar uma contaminação acidental. A rápida esterilização dos porta-filtros pode ser efetuada atra^{vés} da exposição a radiações ultravioleta durante 2 minutos ou imersão em água fervente durante, no mínimo, 30 minutos. Para o controle da esterilidade de cada porta-filtro usado, efetuar a filtração de um volume de 100 mL de água de diluição tamponada estéril antes da filtração das amostras e após 10 filtrações no mesmo porta-filtro.

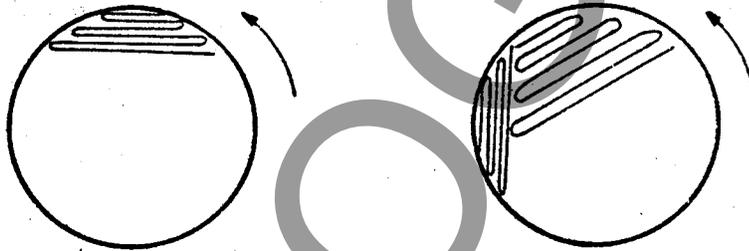
6.3.17 Testes de verificação

Se for requerida a confirmação das colônias típicas em Ágar M-Enterococos, proceder conforme descrito em 6.3.17.1 a 6.3.17.3.

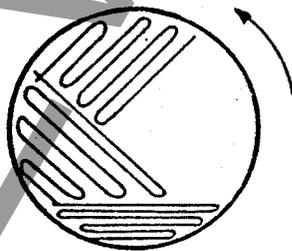
6.3.17.1 Identificar placas contendo ágar infusão de cérebro e coração correspondentes a cada colônia a ser confirmada.

6.3.17.2 Com auxílio de uma alça de inoculação devidamente flambada e esfriada, transferir um inóculo de cada colônia para a placa correspondente, conforme descrito abaixo:

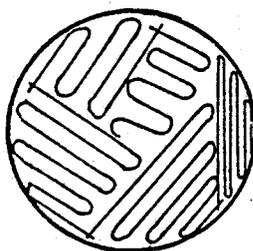
- a) depositar o inóculo em um ponto nas bordas do meio ágar infusão de cérebro e coração contido na placa; girar a placa e iniciar o espalhamento de inóculo na superfície do primeiro quadrante, tomando cuidado para que a parte encurvada da alça toque apenas a superfície do meio de cultura, evitando ferí-lo;
- b) girar novamente a placa e continuar o espalhamento no 2º quadrante;



- c) proceder dessa maneira, até completar a sementeira em toda a superfície do ágar;



- d) fechar e incubar a placa em posição invertida, a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, durante um período de 24 a 48 horas.



Nota: Se, após o período de incubação, não houver crescimento, significa que a colônia não pertence ao grupo dos estreptococos fecais, estando finalizado o exame. Anotar, então, o resultado como negativo para a colônia examinada.

6.3.17.3 Havendo crescimento significativo após o período de incubação determinado, seguir os exames, executando-se o teste de catalase, a coloração de Gram e o enriquecimento da cultura no meio caldo infusão de cérebro e coração (para dar continuidade à confirmação) conforme descrito a seguir:

- a) identificar um tubo de ensaio contendo o meio caldo infusão de cérebro e coração e duas lâminas de vidro limpas;
- b) com o auxílio de uma alça de inoculação flambada e resfriada, colher um inóculo de uma colônia bem isolada no ágar infusão de cérebro e coração e transferi-lo para o tubo com caldo infusão de cérebro e coração correspondente; outros dois inóculos da mesma colônia são transferidos para cada uma das lâminas;
- c) incubar o tubo contendo o caldo infusão de cérebro e coração com o devido inóculo a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas;
- d) em uma das lâminas, realizar o teste da catalase, conforme descrito a seguir:
 - d.1) sobre o inóculo colocado na lâmina, pingar algumas gotas de uma solução recém-preparada de peróxido de hidrogênio a 3%;
 - d.2) com auxílio de uma alça de inoculação flambada e esfriada ou uma haste de madeira estéril, suspender o inóculo nessa solução, através de movimentos circulares;
 - d.3) se houver aparecimento de bolhas, a colônia examinada não pertence ao grupo dos estreptococos fecais, não havendo necessidade de dar continuidade aos testes confirmativos. Anotar o resultado como negativo para a colônia examinada; e
 - d.4) se o teste da catalase for negativo (não formação de bolhas), esse resultado indica provável presença de estreptococos fecais. Dar continuidade aos testes confirmativos, conforme descrito nos itens e) e f).

- e) efetuar a coloração de Gram, utilizando o inóculo da colônia (já transferido para a outra lâmina), conforme descrito a seguir:
- e.1) colocar uma gota de água destilada sobre o inóculo na lâmina;
 - e.2) com a ponta de uma alça de inoculação flambada e resfriada, suspender o inóculo na gota, espalhando-o de modo a formar uma película bem fina;
 - e.3) fixar o esfregaço, passando a lâmina 3 vezes sobre uma chama;
 - e.4) cobrir o esfregaço durante 1 minuto com solução de cristal violeta;
 - e.5) remover o excesso da solução de cristal violeta da lâmina, lavando-a levemente sob água corrente;
 - e.6) cobrir o esfregaço com solução de lugol durante 1 minuto;
 - e.7) decorar o esfregaço usando uma solução de álcool+acetona;
 - e.8) cobrir o esfregaço, durante 15 minutos, com solução de safranina;
 - e.9) lavar a lâmina com água corrente e enxugá-la delicadamente com papel filtro, através de leve compressão do mesmo sobre a lâmina; e
 - e.10) examinar as lâminas ao microscópio, usando objetiva de imersão e anotar o resultado obtido.

Nota: Os estreptococos fecais apresentam-se, nessa coloração, como cocos Gram-positivos (corados em roxo), com 0,5 a 1,0 μm de diâmetro, ocorrendo principalmente aos pares ou em cadeias curtas.

- f) a partir do crescimento obtido em caldo infusão de cérebro e coração após 24 horas de incubação a 35°C (item 6.3.17.3.-c), efetuar os seguintes testes confirmativos: crescimento em ágar bile esculina, crescimento a 45°C e crescimento na presença de 6,5% de cloreto de sódio, conforme descrito a seguir:

- f.1) crescimento em ágar bile esculina:

- identificar placas contendo ágar bile esculina em

correspondência a cada tubo de caldo infusão de cérebro e coração;

- agitar bem cada tubo de caldo infusão de cérebro e coração e, com uma alça de inoculação devidamente flambada e resfriada, retirar um inóculo da cultura, transferindo-o para a placa de ágar bile esculina e efetuando seu espalhamento na superfície do meio conforme descrito em 6.3.17.2.a a 6.3.17.2.c;
- fechar e incubar a placa em posição invertida a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas;
- após esse período, efetuar a leitura, considerando como resultado positivo a ocorrência de colônias com coloração castanho-enegrecida com halo marrom;
- anotar os resultados.

f.2) crescimento a 45°C :

- identificar novos tubos contendo caldo infusão de cérebro e coração em correspondência a cada cultura nesse meio a ser submetida ao teste;
- agitar cada cultura e, com uma alça de inoculação devidamente flambada e resfriada, transferir um inóculo de cada cultura para o tubo correspondente de caldo infusão de cérebro e coração;
- incubar os tubos inoculados a $45 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas;
- após esse período, efetuar a leitura, considerando resultado positivo para estreptococos fecais o crescimento nesse meio, evidenciado pela turvação de mesmo;
- anotar os resultados.

f.3) crescimento na presença de cloreto de sódio na concentração de 6,5%:

- identificar tubos contendo caldo infusão de cérebro e coração com 6,5% de cloreto de sódio, em corespondência a cada cultura em caldo infusão de cérebro e coração a ser submetida ao teste;
- agitar cada cultura e, com uma alça de inoculação devidamente flambada e resfriada, transferir um inóculo das mesmas para o tubo correspondente de caldo infusão de cérebro e coração com 6,5% de clo

- reto de sódio;
- incubar os tubos inoculados a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas;
 - após esse período, efetuar a leitura, verificando se houve ou não crescimento da cultura testada. Nesse teste, usado para diferenciação dos enterococos de outros estreptococos fecais, são os seguintes os resultados a serem considerados:

Crescimento com 6,5% de NaCl	+	Enterococos
	+ ou -	Estreptococos fecais

- anotar os resultados.

6.3.17.4 Após a realização de todos os testes confirmativos, considerar, para cada colônia examinada:

- a) resultados negativos no teste de catalase, coloração de Gram com cocos Gram-positivos, crescimento de colônias castanho-enegrecidas, em ágar bile esculina e crescimento a 45°C em caldo infusão de cérebro e coração indicam que a colônia examinada pertence ao grupo dos estreptococos fecais;
- b) colônias com todas estas características, e que também apresentaram crescimento na presença de 6,5% de cloreto de sódio em caldo infusão de cérebro e coração, são pertencentes ao subgrupo dos enterococos. Para o esquema de procedimento de todo o processo, vide Figura 2.

7 RESULTADOS

7.1 Cálculo

7.1.1 Se não foi requerida a realização dos testes confirmativos, a partir da contagem de colônias típicas de estreptococos fecais em ágar M-enterococos, calcular a densidade destas bactérias em 100 mL da amostra, através da aplicação da seguinte fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de colônias de estreptococos fecais/100 mL} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de colônias típicas em ágar M-enterococos}}{\text{Volume correspondente da amostra (mL)}} \times 100$$

Nota: Nos casos em que o n^o de colônias típicas foi obtido a partir

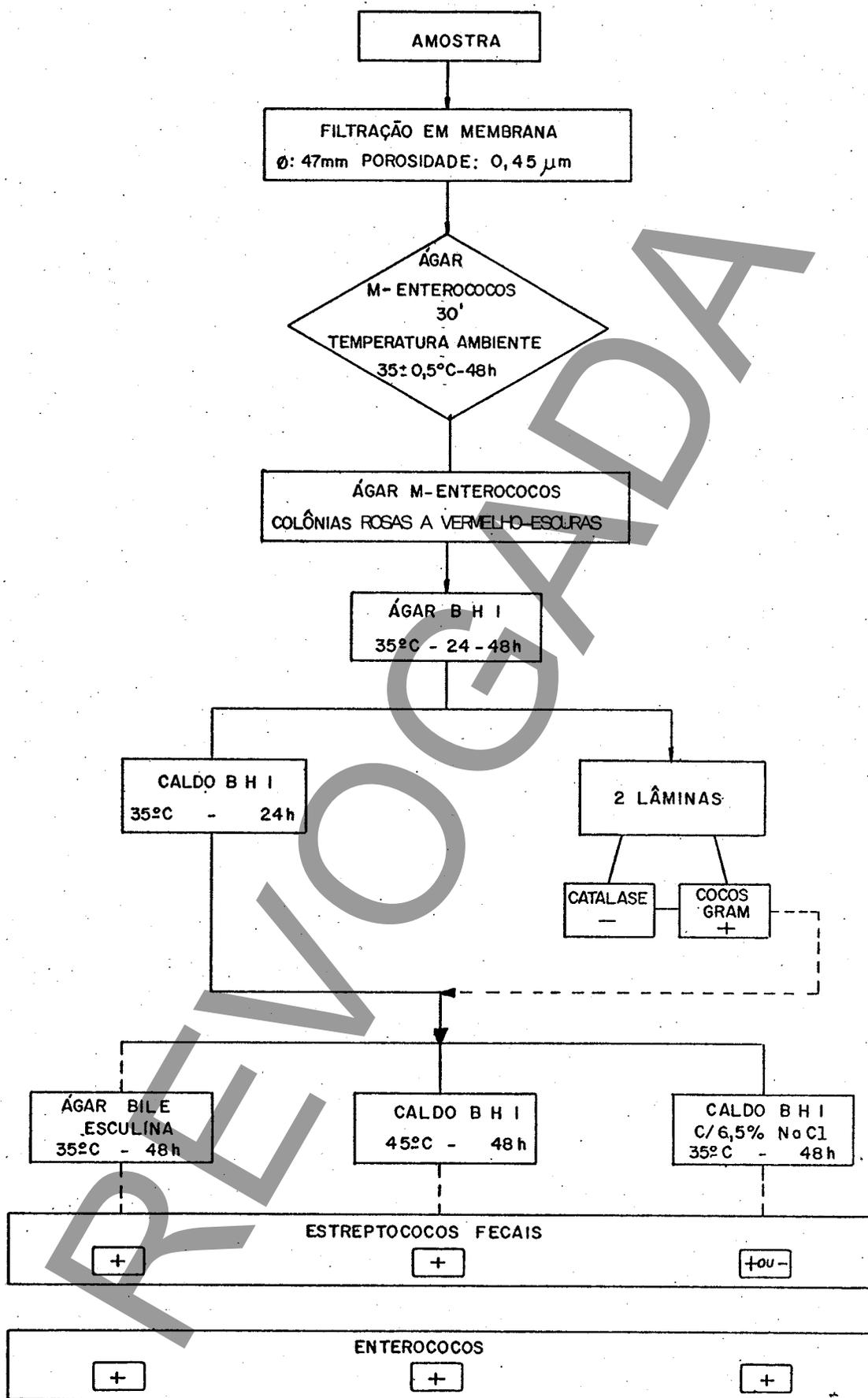


FIGURA 2 - Esquema de procedimento para determinação de estreptococos fecais e enterococos pela técnica de membrana filtrante

da contagem em vários volumes filtrados, conforme item 6.3.16.4, calcular a densidade em 100 mL através da seguinte fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ de colônias de estreptococos fecais/100 mL} = \frac{\text{soma das colônias de estreptococos fecais}}{\text{soma dos volumes correspondentes às contagens (mL)}} \times 100$$

7.1.2 Se foram realizados os testes confirmativos, há dois casos a serem considerados:

$$\text{N}^\circ \text{ de colônias de estreptococos fecais/100 mL} = \frac{\text{soma das colônias de estreptococos fecais}}{\text{soma dos volumes correspondentes às contagens (mL)}} \times 100$$

7.1.2.1 Quando todas as colônias típicas, na placa selecionada para leitura, foram submetidas à confirmação. Neste caso, calcular a densidade em 100 mL através da aplicação das seguintes fórmulas:

$$\text{N}^\circ \text{ de colônias de estreptococos fecais/100 mL} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de colônias confirmadas como estreptococos fecais}}{\text{volume correspondente da amostra (mL)}} \times 100$$

$$\text{N}^\circ \text{ de colônias de enterococos/100 mL} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de colônias confirmadas como enterococos}}{\text{volume correspondente da amostra (mL)}} \times 100$$

7.1.2.2 Quando apenas uma parcela das colônias típicas em ágar M-enterococos foram submetidas à confirmação, há dois casos a serem considerados:

- a) quando a porcentagem de confirmação for 100%; calcular a densidade de estreptococos fecais (ou de enterococos) através da aplicação da fórmula apresentada em 7.1.1;
- b) quando apenas parte das colônias, submetidas aos testes confirmativos, forem confirmadas como estreptococos fecais (ou enterococos), aplicar inicialmente a fórmula apresentada a seguir para o cálculo do n° total de colônias confirmadas:

$$\text{N}^\circ \text{ total de colônias confirmadas} = \frac{\left(\text{N}^\circ \text{ total de colônias típicas em ágar} \right) \times \left(\frac{\text{N}^\circ \text{ de colônias confirmadas}}{\text{M-enterococos}} \right)}{\text{n}^\circ \text{ de colônias submetidas à confirmação}}$$

A seguir, calcular a densidade de estreptococos fecais (ou de enterococos), aplicando-se as fórmulas apresentadas no item 7.1.2.1.

7.1.3 Nos casos em que todos os volumes filtrados fornecerem contagens iguais a zero, se esses volumes não totalizaram 100 mL, considerar como sendo 1 a contagem no maior volume filtrado e usar a fórmula geral apresentada no item 7.1.1, para o cálculo da densidade

de estreptococos fecais em 100 mL (ver item 7.2.4 para a expressão dos resultados).

7.2 Expressão dos resultados

7.2.1 A densidade de estreptococos fecais (ou enterococos), determinada através da técnica de membrana filtrante, é expressa como:

Nº de colônias de estreptococos fecais (ou enterococos)/100 mL

7.2.2 Nos casos em que não foi possível efetuar a contagem, devido a crescimento confluyente, expressar o resultados como:

Contagem prejudicada devido a crescimento confluyente

Nota: Nestes casos, solicitar nova coleta da amostra e selecionar volumes mais adequados para a filtração, visando obter contagens dentro dos limites aceitáveis (20 a 60 colônias típicas).

7.2.3 No caso especificado em 6.3.16.3, expressar o resultado obtido precedido do sinal > (maior que):

Nº de colônias de estreptococos fecais/100 mL: > valor obtido

7.2.4 No caso especificado em 7.1.3, expressar o resultado obtido precedido do sinal < (menor que):

Nº de colônias de estreptococos fecais/100 mL: < valor obtido

7.2.5 Nos casos em que todos os volumes filtrados fornecerem contagens iguais a zero, mas os mesmos totalizarem 100 mL, expressar o resultado como:

Nº de colônias de estreptococos fecais/100 mL: < 1.

REVOGADA

ANEXO A - TESTES BIOQUÍMICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE ESTREPTOCOCOS FECAIS

A-1 Para aplicação nos casos em que for requerida a especificação dos estreptococos fecais, são apresentados, na Tabela a seguir, as reações bioquímicas que caracterizam cada espécie desse grupo.

TABELA - Características bioquímicas das espécies componentes do grupo dos estreptococos fecais

Grupo dos estreptococos fecais						
Subgrupo dos enterococos						
Testes	espécies					
	<u>E. faecalis</u>	<u>E. faecium</u>	<u>E. avium</u>	<u>E. gallinarum</u>	<u>S. bovis</u>	<u>S. equinus</u>
Catalase	-	-	-	-	-	-
Crescimento em 40% de bile	+	+	+	+	+	+
Hidrólise da esculina	+	+	+	+	+	+
Crescimento a 45°C	+	+	+	+	+	+
Crescimento com 6,5% de NaCl	+	+	+	+	-	-
Crescimento a 10°C	+	+	+	+	-	-
Utilização do piruvato	+	-	-	-	-	-
Atividade da fosfatase	+	-	+	+	-	-
Hidrólise da arginina	+	+	- ^d	-	-	-
Fermentação da L-sorbose	-	-	+	-	-	-
Fermentação da lactose	+	+	+	+	+	+
Atividade n-acetil β glicosaminidase	- ^d	-	-	+	-	-
Hidrólise do amido	-	-	-	-	+	-
Arabinose	-	+	+	-	-	-

Notas: + : 90% das cepas são positivas
 - : 90% das cepas são negativas
 d : reações variáveis

REVOGADA

ANEXO B - RECOMENDAÇÕES DE ORDEM GERALB-1 Cuidados especiais com a vidraria

Devem ser obedecidas as prescrições da Norma CETESB M1.001.

B-2 Controle de qualidade da água destilada

A água destilada, a ser empregada no preparo de meios de cultura e soluções, deve ser de alta qualidade, livre de substâncias tóxicas ou nutritivas que possam influenciar na sobrevivência e crescimento de microrganismos. É recomendável a avaliação periódica de sua qualidade, através da realização de testes específicos. Ver Norma CETESB L5.215 - Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos.

B-3 Armazenamento de meios de cultura desidratados

Os frascos de meios de cultura devem ser mantidos hermeticamente fechados em suas embalagens, em local fresco e seco, protegidos da luz. Em laboratórios não equipados com ar condicionado, o armazenamento dos meios desidratados deve ser efetuado colocando-se os frascos de boca para baixo; isto produz um efeito de selagem conveniente ao redor da tampa de rosca, que retardará a decomposição do meio.

B-4 Cuidados no preparo de meios de cultura

Quando forem usados meios desidratados, os mesmos deverão estar inalterados quanto à cor, odor e consistência e, principalmente, não se apresentarem endurecidos. Os recipientes utilizados para a preparação dos meios deverão ser inertes, para que não liberem substâncias, tais como cobre, zinco, alumínio, etc., que irão alterar os constituintes do meio. A azida sódica (NaN_3), contida nos meios de cultura para detecção de estreptococos fecais, é uma substância altamente tóxica e mutagênica e precauções devem ser tomadas no sentido de se evitar contato com a mesma, especialmente por inalação do pó fino desprendido durante a preparação dos meios, como também o contato com a pele. Meios de cultura contendo azida sódica não devem ser misturados com ácido inorgânico forte, porque pode ser produzido um ácido tóxico (ácido hidrazólico $-\text{NH}_3$). Após a utilização da azida sódica, recomenda-se que antes do descarte seja efetuada sua neutralização com uma solução a 10% de citrato de amônio cérico.

B-5 Controle de qualidade de meios de cultura

É recomendável a realização de testes específicos para avaliação e controle de qualidade de meios de cultura a serem empregados na de

terminação de Estreptococos Fecais pela Técnica de Membrana Filtrante. Ver Norma CETESB L5.216 - Controle de qualidade de meios de cultura.

B-6 Qualidade das membranas filtrantes

Para aplicações microbiológicas, as membranas filtrantes devem proporcionar uma completa retenção das bactérias em sua superfície e velocidade de filtração satisfatória. Devem, ainda, ser resistentes ao uso, livres de glicerina e não devem apresentar áreas hidrofóbicas. As dificuldades básicas encontradas com membranas filtrantes normalmente se relacionam com distribuição dos poros, presença de áreas hidrofóbicas, toxidez da tinta empregada da impressão do quadriculado em sua superfície e com o próprio material empregado em sua confecção.

B-6.1 Poros

Os poros da membrana filtrante devem ser uniformes em diâmetro e apresentar-se uniformemente distribuídos. Poros com diâmetros irregulares determinam diferenças na velocidade de filtração em diferentes áreas da membrana. A membrana deve ser livre de áreas não porosas que impeçam a difusão de nutrientes para sua superfície, pois qualquer célula bacteriana retida em tais áreas não se desenvolverá por falta de nutrientes.

B-6.2 Tipo de tinta empregada na impressão do quadriculado

Algumas tintas utilizadas para essa finalidade têm ação bactericida ou bacteriostática. Tais efeitos podem ser reconhecidos através da inibição do crescimento das colônias nas áreas adjacentes às linhas do quadriculado. Estas restrições no crescimento das colônias podem ainda ser derivadas da utilização de tintas hidrofóbicas que impedem a difusão do meio de cultura para áreas em que a membrana foi empregada. A impressão do quadriculado na superfície da membrana não deve ser muito forte, pois disto pode resultar a ruptura da membrana nessas linhas, propiciando o crescimento confluyente nos canais que se formam. Portanto, a impressão do sistema quadriculado em sua superfície deve ser feita com tinta que não estimule ou iniba o desenvolvimento normal das colônias. Além disto, devem permanecer inertes às reações bacterianas e inalteráveis em suas características físico-químicas que podem afetar a seletividade e sensibilidade do meio de cultura. Quanto ao tempo de armazenamento das membranas filtrantes, recomenda-se um período máximo de 12 meses, pois podem ocorrer alterações em suas características físico-químicas com o decorrer do tempo, determinando perda da flexibilidade, havendo ruptura da membrana nos

pontos de pressão criados durante a manipulação; além disto, durante a filtração, freqüentemente ocorre curvatura das bordas da membrana, impedindo o contato com o substrato.

B-7 Esterilização de membranas filtrantes

A esterilização de membranas filtrantes é essencial em todas as aplicações envolvendo filtração de líquidos para a remoção de bactérias e para uso na quantificação de bactérias pela técnica de membrana filtrante.

Usualmente, as membranas filtrantes são embaladas individualmente, ou acondicionadas em envelopes fechados contendo 10 (dez) unidades, sendo pré-esterilizadas pelo fabricante, estando, portanto, prontas para uso. Quando isto não ocorre, a esterilização deve ser feita através de autoclavação a 121°C, durante 10 (dez) minutos; imediatamente após este período, deve-se efetuar a exaustão do vapor da autoclave e as membranas devem ser prontamente removidas para minimizar sua exposição ao calor. A exposição excessiva das membranas filtrantes às temperaturas de esterilização pode determinar o fechamento dos poros, disto decorrendo a não uniformidade na velocidade de filtração em toda área da membrana; além disto, as membranas podem se tornar mais frágeis e quebradiças.

Comercialmente, a pré-esterilização das membranas filtrantes pode ser feita através de autoclavação, radiação gama ou exposição a óxido de etileno. Um estudo comparativo, relativo à avaliação de membranas filtrantes pré-esterilizadas, demonstrou haver um aumento significativo na taxa de recuperação bacteriana em membranas esterilizadas por autoclavação em relação a membranas esterilizadas por exposição a óxido de etileno, sugerindo a presença de resíduos tóxicos nas membranas esterilizadas por esse último método. Neste sentido, para laboratórios que estão utilizando membranas filtrantes pré-esterilizadas por óxido de etileno, é aconselhável que alguns pacotes de membrana do lote em uso sejam autoclavadas no laboratório, para uma posterior comparação com as membranas pré-esterilizadas por óxido de etileno, através da aplicação de teste de recuperação bacteriana, utilizando culturas puras de bactérias. Este teste irá evidenciar se resíduos tóxicos ainda estão presentes nas membranas pré-esterilizadas por óxido de etileno e, se isto ocorrer, é recomendável que todo lote seja submetido a uma autoclavação a 121°C, durante 10 (dez) minutos, antes de sua utilização em laboratório.

B-8 Controle da eficiência da autoclave

Utilizar ampolas com suspensão de esporo de Bacillus stearothermophilus em meio de cultura, colocando-as no centro da caixa contendo os meios de cultura a serem esterilizados. Estas ampolas, depois da autoclavagem, são incubadas em banho-maria a 55°C, durante 24-48 horas. Se houver mudança da coloração da suspensão contida nas ampolas, de roxa para amarela, significa que a esterilização foi insuficiente, pois houve desenvolvimento de bactérias.

B-9 Cuidados especiais na esterilização rápida de porta-filtros

A esterilização dos porta-filtros através de imersão em água fervente é uma prática arriscada, que pode levar a sérias queimaduras, devido a respingos e derramamentos. Portanto, para a rápida esterilização dos mesmos, entre cada série de amostras filtradas no mesmo porta-filtro, deve-se dar preferência à exposição a radiação ultravioleta.

B-10 Cuidados especiais com as membranas filtrantes

As membranas filtrantes são facilmente danificadas. Em sua manipulação, deve-se segurá-las sempre pela sua parte periférica, usando pinças adequadas, com as extremidades arredondadas. Antes do uso, deve-se imergir as extremidades dessas pinças em álcool para posterior flambagem.

/ANEXO C

- C-1 AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Microbiological examination of water. In: Standard methods for the examination of water and wastewater. 17 ed., Washington, APWA, AWWA, WPCF, 1989.
- C-2 BORDNER, R.& WINTER, J. ed. Microbiological methods for monitoring the environment: water and wastes. U.S. Environmental Protection Agency, 1978, 338p. (EPA/600/8-78-017).
- C-3 CETESB. Controle de qualidade de meios de cultura. São Paulo, 1987 (Norma Técnica L5.216).
- C-4 _____. Estreptococos fecais - Determinação em amostras de água pela técnica de membrana filtrante. São Paulo, 1984 (Norma Técnica L5.211).
- C-5 _____. Estreptococos fecais - Determinação do número mais provável pela técnica de tubos múltiplos. São Paulo, 1984 (Norma Técnica L5.205).
- C-6 _____. Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratórios de microbiologia. São Paulo, 1986 (Norma Técnica M1.001).
- C-7 _____. Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos. São Paulo, 1985 (Norma Técnica L5.215).
- C-8 _____. Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água, da CETESB. São Paulo, 1988.
- C-9 DIFCO LABORATORIES. Difco manual: Dehydrated culture media and reagents for microbiology. 10 ed. Detroit, 1984, 1155p.
- C-10 HARDIE, J.M. Gram-positive cocci. Genus Streptococcus Rosenbach 1884 - 22^{al}. In: SNEATH, P.H.A. et al. (ed.) Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore, Williams & Wilkins, 1986, 2: sec 12p. 1043-1071.
- C-11 MANUFACTURING CHEMISTS ASSOCIATION. Guide for safety in the chemical laboratory. 2 ed. New York, Van Nostrand Reinhold Company, 1972:

- C-12 MOORE, W.E.C., CATO, E.P. & MOORE, L.V.H. Index of the bacterial and yeast nomenclature changes published in the International Journal of Systematic Bacteriology since the 1980 - approved lists of bacterial names (Jan.1980 to Jan.1985). International Journal of Systematic Bacteriology, 35 (3): 382-407, 1985.
- C-13 ROUFF, K. L. An update on streptococcal taxonomy. Clinical Microbiology Newsletter, 10(1): 1-8, 1988.
- C-14 SCHLEIFER, K. H. & KILPPER-BÄLZ, R. Transfer of Streptococcus faecalis and Streptococcus faecium to the Genus Enterococcus nom. rev. as Enterococcus faecalis comb.nov. and Enterococcus faecium comb. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 34 (1); 31-34, 1984.