



NORMA TÉCNICA

L5.232

Dez/1990
40 PÁGINAS

E. Coli enteropatogênica: método de isolamento e identificação em amostras de água - método de ensaio

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
Avenida Professor Frederico Hermann Jr., 345
Alto de Pinheiros CEP 05459-900 São Paulo SP
Tel.: (11) 3133 3000 Fax.: (11) 3133 3402

<http://www.cetesb.sp.gov.br>

CETESB	<u>E. coli</u> enteropatogênica - MÉTODO DE ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO EM AMOSTRAS DE ÁGUA	L5.232
	Método de ensaio	DEZ/90

SUMÁRIO	Pág.
Introdução.....	1
1 Objetivo.....	2
2 Normas e documento complementares.....	2
3 Definições.....	3
4 Aparelhagem.....	6
5 Execução do ensaio.....	11
6 Resultados.....	31
Anexo A - Esquema de procedimento.....	33
Anexo B - Recomendações de ordem geral.....	35
Anexo C - Referências bibliográficas.....	39

INTRODUÇÃO

Escherichia coli tem sido utilizada como indicador de contaminação fecal desde o final do século passado, quando ESCHERICH (1885) observou que essa bactéria não só ocorria em alta densidade em fezes humana, mas também estava frequentemente associada com o bacilo da febre tifóide.

A presença de E.coli em água, além de ser importante para indicar contaminação fecal, pode representar risco à saúde humana, uma vez que algumas linhagens são associadas, em maior ou menor grau, com diarreia humana, principalmente diarreia infantil. Atualmente, quatro categorias de Escherichia coli são reconhecidas como agentes etiológicos da diarreia humana: E.coli enteropatogênica clássica (EPEC), enteroinvasora (EIEC), enterotoxigênica (ETEC) e enterohemorrágica (EHEC). Cada uma dessas categorias apresenta característica distintas em relação à patogenicidade, síndrome clínica e epidemiologia, e estão associadas a grupos específicos de antígenos somáticos e flagelares.

Vários estudos realizados em diferentes partes do mundo tem demonstrado que as E.coli enteropatogênicas são a principal causa de diarreia, especialmente entre crianças de comunidades pobres, onde as condições higiênicas básicas, a disposição de esgoto e o abastecimento de água são precários.

A ocorrência de E.coli enteropatogênica no meio ambiente tem sido ra

ramente estudada; entretanto, a importância da água contaminada, na veiculação desses patógenos, tem sido registrada por vários setores. No período de 1955 a 1969, foram reportados na França, Hungria, Israel, Romênia, Suécia e Estados Unidos epidemias e surtos de gastroenterites, veiculados pela água, associados com as E.coli enteropatogênicas clássicas (EPEC) e enteroinvasoras (EIEC). Em 1975, ocorreu o primeiro surto descrito de gastroenterite provocado por E.coli enterotoxigênica (ETEC), veiculado pela água de abastecimento do Crater Lake National Park, em Oregon, USA. No Caribe e na Alemanha também foram notificados surtos de gastroenterites associados à veiculação de ETEC pela água.

Estudos sobre a frequência de E.coli enteropatogênica em águas superficiais (doce e salgada) recreacionais e potáveis não são facilmente encontrados na literatura, e os dados não são estritamente comparáveis, uma vez que não existe até o momento uma metodologia padrão para a detecção específica de E.coli patogênicas em amostras ambientais. Os biosorotipos presentes em amostras de água são bastante variáveis e a maioria das ETEC isoladas são produtoras somente de toxina termolábil (LT). O isolamento de E.coli patogênicas nem sempre está associado ao grau de poluição das águas.

A importância da água na epidemiologia das gastroenterites por ETEC tem sido muito estudada na Tailândia, onde se tem observado uma maior frequência desses patógenos em amostras de água na residência de indivíduos infectados do que na residência de indivíduos saudáveis. Em São Paulo, frequências relativamente significantes de E.coli enteropatogênicas tem sido observadas em amostras de água doce, salgada e águas de consumo humano não clorada, podendo representar risco à saúde pública.

1 OBJETIVO

Esta Norma prescreve o método para isolamento e identificação de E.coli enteropatogênica clássica (EPEC), enteroinvasora (EIEC) e enterotoxigênica (ETEC), em águas destinadas ao consumo humano, águas doces (superficiais ou subterrâneas), salobras e salinas e em águas residuárias domésticas ou industriais.

2 NORMAS E DOCUMENTO COMPLEMENTARES

Na aplicação desta Norma é necessário consultar:

- M1.001 - Lavagem, preparo e esterilização de materiais em labo

ratório de microbiologia

- L5.215 - Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos
- L5.216 - Controle de qualidade de meios de cultura
- L5.230 - E.coli - Determinação pela técnica de membrana filtrante
- L5.501 - Preparo de culturas celulares para ensaios virológicos
- Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água, da CETESB.

3 DEFINIÇÕES

Para os efeitos desta Norma são adotadas as definições de 3.1 a 3.10.

3.1 Escherichia coli (E.coli)

Principal componente do subgrupo dos coliformes fecais ou coliformes termotolerantes, capaz de se desenvolver e fermentar a lactose com produção de ácido e gás à temperatura de $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, em 24 horas. Para efeito desta Norma foram consideradas também as colônias incapazes de fermentar a lactose, característica bioquímica específica das E.coli enteroinvasoras.

3.2 E.coli enteropatogênicas clássicas (EPEC)

Primeira categoria de E.coli enteropatogênica associada à diarreia humana, durante a década de 40 e ainda hoje um dos principais agentes etiológicos da diarreia infantil em países subdesenvolvidos. O mecanismo de virulência das EPEC não está completamente esclarecido, mas sabe-se que envolve a adesão desses colibacilos ao epitélio intestinal e talvez a produção de citotoxinas. Dentro dessa categoria são considerados os seguintes sorogrupos de E.coli: 026, 055, 086, 0111ab, 0114, 0125ac, 0126, 0127, 0128ab, 0142 e 0158.

3.3 E.coli enteroinvasora (EIEC)

As EIEC correspondem a biosorotipos bem definidos, caracterizados pelos seus antígenos O, ausência de antígeno flagelar (o único biosorotipo móvel é o 0124:H₃₀) e incapacidade de descarboxilar a lisina. Esses colibacilos apresentam a capacidade de invadir e multiplicar-se dentro das células do epitélio intestinal, preferencialmente na região do cólon, provocando ulceração no local da infecção e produção de diarreia com muco e sangue, semelhante ao mecanismo de patogenicidade das Shigella. As EIEC estão associadas tanto com diarreia em crianças como em adultos e englobam 10 diferentes sorogrupos: 028ac, 029, 0112ac, 0124, 0136, 0143, 0144, 0152, 0164 e 0167.

3.4 E.coli enterotoxigênica (ETEC)

As ETEC constituem um grupo de bactérias de diferentes sorotipos que apresentam a capacidade de colonizar o intestino delgado proximal, onde produzem enterotoxinas termolábil (LT) e termoestável (ST). A toxina LT é de alto peso molecular, imunogênica e, igualmente à toxina da cólera, leva à ativação da adenilciclose dos enterócitos, provocando um aumento intracelular do AMP cíclico que desencadeará o processo desidratante. Atualmente são conhecidos dois tipos de enterotoxinas LT: as LT-I, que compreendem a LT humana (LTh) e LT suína (LTp), biologicamente e estruturalmente semelhantes, e as LT-II, que possuem atividade biológica semelhante à LT-I, mas estruturalmente são diferentes da LTh e LTp. A toxina é de baixo peso molecular, não imunogênica e sua atividade está relacionada à ativação da guanidil-ciclastase, ocasionando um aumento do GMP cíclico nas células do epitélio intestinal. No momento já foram descritos dois tipos de enterotoxina ST: ST_a ou ST_I e ST_b ou ST_{II}.

3.5 E.coli enterohemorrágica (EHEC)

As EHEC constituem uma classe de E.coli enteropatogênica recentemente associada à colite hemorrágica, pertencente ao sorotipo O157:H7. Essas bactérias apresentam capacidade de produzir citotoxinas semelhantes à toxina de Shiga, denominadas SLT-I e SLT-II.

3.6 Ágar m-TEC

Meio seletivo e diferencial para determinação de E.coli, no qual a acidificação decorrente de fermentação da lactose é evidenciada pela coloração amarela das colônias, devido à viragem do indicador de pH (vermelho de fenol). Colônias lactose-negativas apresentam-se com cor púrpura.

3.7 Ágar MacConkey

Meio seletivo e diferencial utilizado no isolamento de enterobactérias. Colônias fermentadoras da lactose acidificam o meio e são evidenciadas pela coloração vermelho-tijolo, decorrente da viragem do indicador de pH (vermelho neutro). Colônias lactose-negativas apresentam-se transparentes.

3.8 Ágar EPM

Meio de Rugai e Araújo modificado, no qual são testadas simultaneamente 5 diferentes reações bioquímicas, utilizadas na triagem de enterobactérias, a saber:

- a) fermentação da glicose - determinada pelo aparecimento de coloração amarela no meio, decorrente da acidificação do meio

- e conseqüente viragem do indicador de pH;
- b) produção de gás - evidenciada pela formação de bolhas no meio;
 - c) produção de sulfeto de hidrogênio - algumas enterobactérias são capazes de reduzir o tiosulfato a sulfeto de hidrogênio; este, por sua vez, combina-se com o íon presente no citrato férrico amoniacal, dando origem ao sulfeto férrico que causa enegrecimento do meio;
 - d) L-triptofano desaminase (LTD) - evidenciada pela coloração esverdeada no ápice do meio EPM, decorrente da formação de ácido indol pirúvico; e
 - e) urease - a presença de urease é evidenciada pela coloração azul na base do meio EPM, decorrente de alcalinização do meio pela formação de amônia e conseqüente viragem do indicador de pH (azul de bromotimol).

3.9 Meio Mili

Meio de triagem utilizado, juntamente com o meio EPM, na identificação de enterobactérias, no qual são testados simultaneamente 3 características distintas:

- a) motilidade - observada pelo crescimento no meio, decorrente da presença de flagelos. As culturas imóveis apresentam crescimento restrito ao local da picada;
- b) produção de indol - algumas enterobactérias possuem a enzima triptofanase, que degrada o aminoácido heterocíclico triptofano e formam o indol. A presença deste composto é verificada através da adição do reagente KOVAC, que se torna vermelho na presença de indol; e
- c) presença de lisina - descarboxilase - é evidenciada pelo aparecimento de coloração violeta no meio, decorrente da alcalinização do mesmo pela aminas cadaverinas resultantes da descarboxilação da lisina e conseqüente viragem do indicador de pH (púrpura de bromocresol).

3.10 Citrato de Simmons

Meio empregado na diferenciação de enterobactérias, onde se observa a utilização do citrato como única fonte de carbono. As bactérias que utilizam o citrato formam, por metabolismo oxidativo, o carbonato de sódio, alcalinizando o meio e mudando sua cor inicial de verde para azul, devido à viragem do indicador de pH.

4 APARELHAGEM

4.1 Equipamentos

4.1.1 Balança

Com sensibilidade de, no mínimo, 0,1 g ao serem pesadas 150 g¹.

4.1.2 Banho-maria

Equipado com termostato e agitador de baixa velocidade para promover a circulação de água e manter a temperatura uniforme em todos os pontos. A temperatura do banho-maria para determinação de E.coli deve ser de $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ e, para provas sorológicas, $48 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$. O nível de água no banho-maria deve ser suficiente para manter imersas as placas de m-TEC e os tubos de sorologia até o nível superior da suspensão de bactérias mais soro. Recomenda-se a troca semanal da água do banho-maria, para evitar a proliferação de fungos e outros microrganismos².

4.1.3 Capela de segurança biológica (câmara de fluxo laminar vertical)

Equipamento que possibilita a retenção de partículas do ar através da passagem do mesmo por filtros HEPA, cuja eficiência é de 99,99% para partículas iguais ou maiores a 0,3 μm . O ar estéril produzido é dirigido em forma de fluxo direto sobre a área de trabalho, proporcionando grande segurança nos manuseios que devem ser realizados em condições de máxima esterilidade, como também proteção dos operadores.

4.1.4 Congeladores

Com regulagem para manter a temperatura na faixa de -20°C ; é destinado ao armazenamento dos extratos de toxina.

4.1.5 Destilador de água ou aparelho para desionização

Devem 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.

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.
2. Devem ser feitos registros contínuos ou periódicos da temperatura e os termômetros usados devem ser graduados com intervalo de escala de $0,1^{\circ}\text{C}$. As estantes a serem colocadas no banho-maria devem ser de aço inoxidável ou aço galvanizado.

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.

4.1.6 Equipamentos para esterilização

4.1.6.1 Autoclave

É normalmente operada a uma pressão de 103 393 Pa (1,05 kgf/cm² ou 15 lb/pol²), produzindo, em seu interior, uma temperatura de 121,6°C ao nível do mar. Em seu funcionamento, deve-se observar a substituição por vapor de todo ar existente na câmara e a operação total desse equipamento deve durar no máximo uma hora, sendo recomendável que a temperatura de esterilização seja atingida em até 30 minutos.

4.1.6.2 Bomba de vácuo e pressão ou outro dispositivo conveniente para produzir uma pressão de 1 kgf/cm².

4.1.6.3 Estufa de esterilização

Deve manter a temperatura de (170 ± 10°C) durante o período de esterilização (mínimo de 2 horas).

4.1.6.4 Lâmpadas germicidas (ultravioleta)

São usadas na descontaminação dos porta-filtros entre as sucessivas séries de filtrações e para esterilização das placas de plástico não autoclavável.

4.1.6.5 Porta filtro

De aço inoxidável, com diâmetro de 142 mm.

4.1.6.6 Vasilhame de pressão

Com capacidade de 5 litros.

4.1.7 Equipamentos para filtração

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

4.1.7.2 Frasco Kitasato de paredes espessas, para filtração, com capacidade adequada (usualmente 1 a 4L), ou suporte especial para os porta-filtros.

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

4.1.7.4 Porta-filtro de vidro, plástico autoclavável ou aço inoxidável.

4.1.8 Incubadora bacteriológica termostatizada

Deve manter a temperatura na faixa de $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e a umidade entre 75 a 85% e ser colocada em um local onde a temperatura permaneça na faixa de 16 a 27°C .³

4.1.9 Incubadora bacteriológica - CO_2 (35°C)

Deve ter as mesmas características especificadas no item 4.1.8, acrescida de uma demanda constante de atmosfera de CO_2 .

4.1.10 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, pH = 9,18).

4.1.11 Microscópio binocular de focalização invertida

4.1.12 Microscópio estereoscópico binocular

Para ampliação de 10 a 15 diâmetros.

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

4.1.13 Pipetadores automáticos para volumes de 25 μL e 250 μL

4.1.14 Refrigerador

Certificado para manter a temperatura na faixa de 2 a 8°C , com capacidade para contar os meios de cultura e as soluções a serem mantidas sob refrigeração. Sua limpeza e desinfecção devem ser feitas periodicamente.

4.2 Vidraria

4.2.1 Balões

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

4.2.2 Flaconete

Do mesmo tipo utilizado para acondicionar solução de penicilina com capacidade de 20,0 mL e com tampa de borracha.

3. A verificação da temperatura da incubadora deve ser feita periodicamente (mínimo de 2 vezes ao dia) através de termômetros (com 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.

4.2.3 Frascos

Com capacidade de 1 000 mL, com tampa de rosca, para armazenamento do meio de cultura.

4.2.4 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.

4.2.5 Frascos com face plana de 44 cm² para cultivo de células (semente).

4.2.6 Pipetas

Devem ser de borossilicato, tipo Mohr, para 0,1 mL, 0,5 mL, 1,0 mL, 5 mL e 10 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

Devem ser de borossilicato ("pyrex") ou vidro neutro de boa qualidade, com fundo perfeitamente plano, sem ranhuras e bolhas de ar com 100 mm de diâmetro e 15 mm de altura.

4.2.8 Placas de Petri de plástico

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

4.2.9 Provetas graduadas (100 mL) ou porta-filtros graduados com marcação externa.

4.2.10 Tubos de ensaio de borossilicato ou vidro neutro, de 18 mm x 180 mm, 16 mm x 150 mm e 12 x 120 mm.

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 uma alça de 3 mm de diâmetro na extremidade, fixado a um cabo metálico (cabo de Kolle).

4.3.2 Bandejas de plástico ou de aço inoxidável

4.3.3 Bico de Bunsen ou similar

Deve ter funcionamento adequado de modo a produzir combustão completa.

4.3.4 Caixas ou cestas de aço inoxidável

Para esterilização de materiais.

4.3.5 Caixa de Huddlenson

Para teste de aglutinação rápida: caixa de madeira pintada de preto

internamente, salvo uma face, que é pintada de branco, provida de uma lâmpada e uma placa de vidro quadriculada.

4.3.6 Comundongos recém-nascidos (3 a 4 dias de vida).

4.3.7 Estantes

De tamanho adequado para colocação de tubos de ensaio empregados na análise. Para uso no banho-maria, as estantes devem ser de aço inoxidável ou aço galvanizado plastificado.

4.3.8 Estojo para pipetas

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

4.3.9 Membranas de acetato de celulose de 0,22 e 0,45 μ m de porosidade e 142 mm de diâmetro, brancas e estéreis.

4.3.10 Membranas filtrantes com 47 mm de diâmetro e 0,45 μ m de porosidade, brancas, quadriculadas e estéreis.

4.3.11 Microplacas não autoclaváveis

De plástico rígido não tóxico, com tampa de 12,8 cm x 8,6 cm x 1,5 cm; com 96 orifícios de fundo em U.

4.3.12 Micropipetas

De plástico rígido, adaptáveis a micropipetadores de 25 μ L e 50 μ L.

4.3.13 Palitos estéreis ou bastão de vidro para teste sorológico.

4.3.14 Pinças

De aço inoxidável, com as extremidades arredondadas.

4.3.15 Placas de Petri de plástico não tóxico, bem vedadas, de 48 mm de diâmetro x 8,5 mm de altura.

4.3.16 Pré-filtro de fibra de vidro tipo AP-20 com 142 mm de diâmetro estéril.

4.3.17 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).

4.3.18 Seringa descartável de 0,1 mL

4.3.19 Tela de amianto

4.3.20 Tripé

5 EXECUÇÃO DO ENSAIO

5.1 Reagentes

Nota: Os reagentes devem ser de grau bacteriológico e de procedência idônea, apresentar odor, cor e consistências inalteradas, ser livres de elementos bacteriostáticos inespecíficos, bem como carboidratos inespecíficos.

- 5.1.1 Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) p.a.
- 5.1.2 Ácido hidrocloreídrico p.a.
- 5.1.3 Ácido sulfúrico p.a.
- 5.1.4 Ágar.
- 5.1.5 Ágar citrato de Simmons.
- 5.1.6 Ágar MacConkey.
- 5.1.7 Ágar m-TEC.
- 5.1.8 Ágar nutriente.
- 5.1.9 Álcool isoamil p.a.
- 5.1.10 Azul de bromotimol.
- 5.1.11 Base ágar sangue.
- 5.1.12 Bicarbonato de sódio p.a.
- 5.1.13 Caldo de soja e triptoma.
- 5.1.14 Casaminoácidos.
- 5.1.15 Citrato de ferro amoniacal p.a.
- 5.1.16 Cloreto de bário p.a.
- 5.1.17 Cloreto de magnésio p.a.
- 5.1.18 Cloreto de manganês p.a.
- 5.1.19 Cloreto de potássio p.a.
- 5.1.20 Cloreto de sódio p.a.
- 5.1.21 Cloreto férrico hexahidratado p.a.
- 5.1.22 Cloridrato de N, N, N', N' tetrametil-p-fenilenodiamina p.a.
- 5.1.23 Extrato de carne.
- 5.1.24 Extrato de levedura.
- 5.1.25 Fenol p.a.

- 5.1.26 Formaldeído p.a.
- 5.1.27 Fosfato de potássio monobásico p.a.
- 5.1.28 Fosfato de sódio dibásico p.a.
- 5.1.29 Gentamicina.
- 5.1.30 Glicose p.a.
- 5.1.31 Ham F-10 com glutamina e sem bicarbonato.
- 5.1.32 Hidróxido de sódio.
- 5.1.33 L-lisina.
- 5.1.34 L-triptofano.
- 5.1.35 p-dimetil-aminobenzaldeído.
- 5.1.36 Peptona.
- 5.1.37 Púrpura de bromocresol.
- 5.1.38 Soro E.coli enteropatogênica clássica somático polivalente A, B e C.
- 5.1.39 Soro E.coli enteropatogênica clássica somático monovalente: 026, 055, 086, 0111ab, 0114, 0119, 0125ac, 0126, 0127, 0128ab, 0142 e 0148.
- 5.1.40 Soro E.coli enteroinvasora somático polivalente A e B.
- 5.1.41 Soro E.coli enteroinvasora somático monovalente: 028ac, 029, 0112ac, 0124, 0136, 0143, 0144, 0152, 0164 e 0167.
- 5.1.42 Soro E.coli enterotoxigênica somático polivalente I, II e III.
- 5.1.43 Soro E.coli enterotoxigênica somático monovalente 06, 08, 015, 020, 025, 060, 062, 063, 078, 0128ac, 0139 e 0148.
- 5.1.44 Sulfato de magnésio heptahidratado p.a.
- 5.1.45 Tiosulfato de sódio pentahidratado p.a.
- 5.1.46 Tripsina.
- 5.1.47 Triptona.
- 5.1.48 Uréia p.a.
- 5.1.49 Vermelho de fenol p.a.
- 5.2 Meios de Cultura

Nota: Devem ser usados, preferencialmente, meios desidratados de qualidade comprovada; pode-se, no entanto, prepará-los em laboratório a partir de seus componentes específicos.

5.2.1 Ágar m-TEC

Fórmula:

Proteose peptona nº 3.....	5,0 g
Extrato de levedura.....	3,0 g
Lactose.....	10,0 g
Cloreto de sódio p.a.....	7,5 g
Fosfato de potássio dibásico p.a.....	3,3 g
Fosfato de potássio monobásico p.a.....	1,0 g
Lauril sulfato de sódio p.a.....	0,2 g
Desoxicolato de sódio.....	0,1 g
Púrpura de bromocresol.....	0,08 g
Vermelho de bromofenol.....	0,08 g
Ágar.....	15,0 g
Água destilada.....	1 000 mL
pH final após esterilização: $7,3 \pm 0,1$ a 25°C	

Preparo:

Pesar 45,26 g do meio desidratado m-TEC e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Aquecer, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Estabilizar o meio a uma temperatura de 45 a 50°C , em banho-maria e, com todos os cuidados de assepsia, distribuir volumes de 3,5 mL em placas de Petri de 48 mm x 8,5 mm. O meio preparado poderá ser estocado ao abrigo da luz e à temperatura de 2 a 10°C , durante, no máximo, 2 semanas.

5.2.2 Ágar MacConkey

Fórmula:

Peptona.....	17 g
Proteose peptona.....	3 g
Lactose.....	10 g
Sais biliares.....	1,5 g
Cloreto de sódio.....	5 g
Vermelho neutro.....	0,03 g
Cristal violeta.....	0,001 g
Ágar.....	13,5 g

Água destilada..... 1 000 mL
 pH final após esterilização: $7,1 \pm 0,2$ a 25°C

Preparo:

Pesar 50 g do meio desidratado Ágar MacConkey 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. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Estabilizar o meio de cultura a uma temperatura de 55 a 60°C , em banho-maria. Distribuir volumes de aproximadamente 20 mL em placas de Petri de 15 mm x 100 mm, previamente esterilizadas. O meio preparado poderá ser estocado sob refrigeração (2 a 8°C), durante o período máximo de 2 semanas.

5.2.3 Ágar citrato de Simmons

Fórmula:

Sulfato de magnésio.....	0,2 g
Fosfato dihidrogênio de amônio.....	1 g
Fosfato dipotássico.....	1 g
Citrato de sódio.....	2 g
Cloreto de sódio.....	5 g
Azul de bromotimol.....	0,08 g
Ágar.....	15 g
Água destilada.....	1 000 mL
pH final após esterilização: $6,8 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ a 25°C	

Preparo:

Pesar 24,2 g do meio desidratado Ágar Citrato de SIMMONS 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. Distribuir volumes de 6 a 7 mL em tubos de ensaio de 12 mm x 120 mm, esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Deixar o meio solidificar inclinado de maneira a formar uma base e superfície. O meio preparado deverá ser estocado sob refrigeração ($2-8^{\circ}\text{C}$), durante o período máximo de 2 semanas.

5.2.4 Ágar conservação

Fórmula:

Ágar nutriente.....	23,0 g
Peptona.....	5,0 g
Cloreto de sódio p.a.....	5,0 g

Fosfato de sódio dibásico p.a.....	2,0 g
Água destilada.....	1 000 mL
pH final após esterilização: $7,4 \pm 0,2$ a 25°C	

Preparo:

Pesar os componentes e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria, deixando em repouso durante, aproximadamente 15 minutos. Aquecer, agitando freqüentemente, até a completa fusão do agar. Distribuir volumes de 6 a 7 mL em tubos de ensaio de 12 mm x 120 mm, esterilizar em autoclave a 121°C , durante 15 minutos, e deixar o meio solidificar inclinado de maneira a formar uma base e superfície. O meio preparado poderá ser estocado sob refrigeração (2 a 8°C), durante um período máximo de 30 dias.

5.2.5 Base ágar sangueFórmula:

Infusão de coração.....	500 g
Triptose.....	10 g
Cloreto de sódio.....	5 g
Ágar.....	15 g
Água destilada.....	1 000 mL
pH final após esterilização: $6,8 \pm 0,2$ a 25°C	

Preparo:

Pesar 40 g do meio desidratado "Blood Ágar Base" e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Aquecer, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir volumes de aproximadamente 17 mL em tubos 18 mm x 180 mm, tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C , durante 15 minutos. Deixar o meio solidificar inclinado, de maneira a formar uma pequena base e uma superfície de cerca de 10 cm. O meio preparado deverá ser estocado sob refrigeração (2 - 8°C), durante o período máximo de 2 semanas.

5.2.6 Caldo de soja e triptonaFórmula:

Triptona.....	17 g
Soitone (peptona de soja).....	3 g
Dextrose.....	2,5 g
Cloreto de sódio.....	5 g
Fosfato dipotássico.....	2,5 g

Água destilada..... 1 000 mL
 pH final após esterilização: $7,2 \pm 0,1$ a 25°C

Preparo:

Pesar 30 g do meio desidratado caldo de soja e triptona 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. Distribuir volumes de 5 mL em tubos de ensaio de 15 mm x 150 mm, esterilizar em autoclave a 121°C , durante 15 minutos. O meio preparado deverá ser estocado à temperatura ambiente, durante o período máximo de 2 semanas.

5.2.7 Meio EPM

5.2.7.1 Base

Fórmula:

Triptona.....	10,0 g
Extrato de carne.....	3,0 g
Cloreto de sódio p.a.....	5,0 g
Fosfato de sódio dibásico p.a.....	1,225 g
L-triptofano.....	1,0 g
Solução alcoólica de azul de brotímol a 1,5%.....	2,0 g
Ágar.....	11,0 g
Água destilada q.s.p.....	1 000 mL
pH final após esterilização: $7,4$ a 25°C	

Preparo:

Adicionar todos os reagentes à água destilada fria e deixar em repouso por aproximadamente 15 minutos. Aquecer a mistura, agitando frequentemente, até a completa fusão do ágar. Esterilizar o meio em autoclave a 121°C , durante 15 minutos.

5.2.7.2 Solução de indicadores e substratos

Fórmula:

Citrato de ferro amoniacal p.a.....	2,0 g
Tiosulfato de sódio pentahidratado p.a.....	2,0 g
Glicose.....	10,0 g
Uréia p.a.....	40,0 g
Água destilada.....	85 mL

Preparo:

Pesar todos os reagentes, colocá-los em frasco esterilizado de 150 mL

Extrato de levedura.....	6,0 g
Água destilada.....	250 mL

Solução B:

Casaminoácidos.....	20,0 g
Cloreto de sódio p.a.....	2,5 g
Fosfato de potássio dibásico p.a.....	8,7 g
Água destilada.....	750 mL
pH final após esterilização: 8,5 a 25°C	

Preparo:

Esterilizar as soluções por autoclavação a 121°C por 15 minutos, misturá-las após resfriamento e acrescentar 1 mL da solução de sais de Evans.

5.2.9 Solução de sais de EvansFórmula:

Sulfato de magnésio heptahidratado p.a.....	5,0 g
Cloreto de manganês p.a.....	0,5 g
Cloreto férrico hexahidratado p.a.....	0,5 g
Ácido sulfúrico 0,0001N.....	100 mL

Preparo:

Dissolver os reagentes em ácido sulfúrico 0,0001N e esterilizar a solução por filtração em membrana (Millipore) com porosidade de 0,22 µm. Distribuir, em câmara asséptica, volumes de 10 mL em frascos com tampa rosqueada estéreis e armazenar a -20°C.

5.2.10 Meio Ham F10Fórmula:

Ham F10 com glutamina e sem bicarbonato.....	9,81 g
Bicarbonato de sódio a 10% - TC.....	12 mL
Água destilada.....	1 000 mL
pH final após esterilização: 7,0 ± 0,2 a 25°C	

Preparo:

Dissolver um pacote do meio Ham F10 (9,81 g) em água bidestilada e adicionar a solução de bicarbonato de sódio. Agitar constantemente com auxílio de uma barra magnética e esterilizar por filtração, utilizando-se a técnica de sandwich (membrana Millipore AP20, 0,45 µm e 0,22 µm, sendo que as duas últimas, separadas por tela). Distribuir o meio em volumes de 500 mL e, após teste de esterilidade (48 h a 35°C), es

e acrescentar 85 mL de água destilada esterilizada. Aquecer em banho-maria a 65°C, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio. Pasteurizar, mergulhando o frasco até o gargalo em banho-maria a 65°C, durante 1 hora.

5.2.7.3 Meio final

Fórmula:

Base.....	1 000 mL
Solução de indicadores e substrato.....	175 mL

Preparo:

Adicionar (com assepsia) a 1 000 mL da base a, estabilizada a 65°C, 175 mL da solução de indicadores e substratos. O meio é distribuído assepticamente em volumes de 4 mL, em tubos de 12 mm a 120 mm, previamente esterilizados, que são inclinados até a solidificação, de maneira a se obter uma base de, pelo menos, 3,5 cm. O meio preparado, poderá ser estocado sob refrigeração (2 a 8°C), durante o período máximo de 2 semanas.

5.2.7.4 Meio Mili (motilidade-indol-lisina)

Fórmula:

Extrato de levedura.....	3,0 g
Peptona.....	10,0 g
Triptona.....	10,0 g
L-lisina.....	10,0 g
Glicose.....	1,0 g
Ágar.....	2,0 g
Púrpura de bromocresol.....	0,02 g
Água destilada.....	1 000 mL
pH final após esterilização: 6,5 a 25°C	

Preparo:

Adicionar todos os produtos à água destilada fria e deixar em repouso por aproximadamente 15 minutos. Aquecer a mistura, agitando freqüentemente, até a completa dissolução. Distribuir volumes de 5 mL em tubos de 12 mm x 120 mm, esterilizar durante 15 minutos a 121°C e deixar solidificar em posição vertical. O meio preparado poderá ser estocado sob refrigeração (2 a 8°C) durante o período máximo de 2 semanas.

5.2.8 Meio de Evans

Fórmula:

Solução A:

tocar o meio sob refrigeração (2 a 8 °C).

5.3 Soluções

5.3.1 Solução salina 0,85%

Fórmula:

Cloreto de sódio p.a.....	8,5 g
Água destilada.....	1 000 mL

Preparo:

Pesar 8,5 g de cloreto de sódio e dissolver em 1 000 mL de água destilada. Distribuir volumes de aproximadamente 100 mL em frascos de borossilicato ou vidro neutro e esterilizar em autoclave a 121 °C, durante 15 minutos.

5.3.2 Solução salina formolada a 0,6%

Fórmula:

Formaldeído 37% p.a.....	1,6 mL
Cloreto de sódio p.a.....	0,85 g
Água destilada.....	100 mL

Preparo:

Adicionar 1,6 mL de formol em um frasco contendo 100 ml de solução salina a 0,85% e estocar à temperatura ambiente.

5.3.3 Solução salina fenicada a 0,5%

Fórmula:

Fenol p.a.....	0,5 mL
Cloreto de sódio p.a.....	0,85 g
Água destilada.....	100 mL

Preparo:

Adicionar 0,5 mL de fenol em um frasco contendo 100 ml de solução salina a 0,85% e estocar à temperatura ambiente.

5.3.4 Solução de gentamicina 10 mg/mL

Fórmula:

Gentamicina.....	40,0 mg
Tampão fosfato (PBS).....	3,0 mL

Preparo:

Adicionar assepticamente o conteúdo (1 mL) de uma ampola de gentamicina (gentamicina 40 mg) em 3 mL de uma solução de tampão fosfato este

ril. Estocar em flaconetes estéreis a 5°C.

5.3.5 PSB - Solução tampão fosfato (DULBECCO & VOGT, 1954)

Fórmula:

Cloreto de sódio p.a.....	8,0 g
Cloreto de potássio p.a.....	0,2 g
Fosfato de sódio dibásico p.a.....	1,15 g
Fosfato de potássio monobásico p.a.....	0,2 g
Água destilada.....	1 000 mL
pH final após esterilização: 7,4 a 25°C	

Preparo:

Dissolver os reagentes em água bidestilada e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Distribuir volumes de 100 mL em frascos de água de diluição e estocar sob refrigeração (5°C).

5.3.6 Solução tripsina - EDTA:

a) Solução salina

Fórmula:

Solução tampão fosfato (PSB).....	10 000 mL
Vermelho de fenol a 1%.....	15 mL

Preparo:

Adicionar a solução de vermelho de fenol a 1% ao tampão fosfato e autoclavar a 121°C por 15 minutos.

b) Solução de tripsina a 2%

Fórmula:

Tripsina 1:250.....	20,0 g
Solução salina.....	500 mL

Preparo:

Dissolver a tripsina 1:250 em 500 mL da solução salina (item a), mantendo em banho de gelo com agitação constante durante 3 horas, e filtrar em papel de filtro.

c) Solução de EDTA a 2%

Fórmula:

Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) p.a.	2,0 g
Solução salina.....	100 mL

Preparo:

Dissolver o EDTA em 100 mL de solução salina com vermelho de fenol (item a).

d) Solução final

Para o preparo do meio final, juntar as soluções a, b e c e, acertar o pH para 7,5-7,6. Esterilizar o meio por filtração, distribuir em volumes de 500 mL e, após prova de esterilidade, estocar a solução a -20°C .

5.3.7 Água de diluição5.3.7.1 Fórmula:

Solução-estoque A.....	1,25 mL
Solução-estoque B.....	5,00 mL
Água destilada.....	1 000 mL
pH final após esterilização: $7,2 \pm 0,5$ a 25°C	

5.3.7.2 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 geladeira⁴.

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

4. 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.

da. Distribuir volumes adequados à necessidade de uso do laboratório em frascos com tampa de rosca. Esterilizar em geladeira. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos e 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 volumes adequados em balões volumétricos, tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C durante 30 minutos.

5.3.8 Solução de hidróxido de sódio 1N:

Fórmula:

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

Preparo:

Pesar 40,0 g de hidróxido de sódio e dissolver em 1 000 mL de água recém-destilada. Armazenar em frascos com tampa de rosca.

5.3.9 Reagente de KOVAC

Fórmula:

Álcool amil ou isoamil p.a.....	150 mL
P-dimetilaminobenzaldeído p.a.....	10 g
Ácido hidrocloreídrico p.a.....	50 mL

Preparo:

Dissolver o aldeído no álcool, e adicionar lentamente o ácido. Acondicionar em frasco âmbar conta-gotas e estocar na geladeira. Reagentes com coloração marrom escuro não devem ser utilizados.

5.3.10 Reagente para pesquisa da oxidase

Fórmula:

Cloridrato de N, N, N', N', tetrametil-p-fenilenodiamina.....	0,1 g
Água destilada.....	10 mL

Preparo:

Dissolver o reagente em água destilada e guardar a solução em frasco âmbar, em geladeira (2-8°C), durante tempo inferior a 2 dias.

5.3.11 Solução para escala 3 de McFARLAND

Fórmula:

Cloreto de bário p.a.....	1,0 mL
Ácido sulfúrico p.a.....	9,0 mL

Preparo:

Adicionar 1 mL de uma solução de cloreto de bário a 1% em um tubo de 15 x 150 mm com tampa rosqueada e completar para 10 mL com solução de ácido sulfúrico a 1%. Rosquear a tampa e guardar à temperatura ambiente. Esta solução equivale à turvação de uma suspensão de 3×10^6 bactérias/mL.

5.4 Amostragem

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

5.5 Determinação de Escherichia coli pela técnica de membrana filtrante

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

5.5.2 Isolamento de Escherichia coli

Deve ser realizado conforme descrito na Norma L5.230, E.coli - Determinação pela técnica de membrana filtrante, utilizando o meio m-TEC.

5.5.3 Identificação de E.coli

5.5.3.1 Selecionar, para cada amostra analisada, um total de 10 colônias isoladas, no ágar m-TEC, antes das mesmas terem sido submetidas ao teste de urease, sendo 7 colônias lactose-positivas (amarelas) e 3 colônias lactose-negativas (azuis).

5.5.3.2 Com auxílio de uma agulha de inoculação flambada e esfriada, semear as colônias em placas de ágar MacConkey e incubar a 35°C , durante 24 horas, de modo a obter colônias isoladas, certificando-se a pureza da cultura.

Nota: Para esse isolamento, dividir a placa de MacConkey em quadrantes, utilizando cada quadrante para isolamento de 1 colônia.

5.5.3.3 Anotar em formulário específico o resultado relativo à fermentação da lactose no ágar MacConkey, para cada colônia testada.

5.5.3.4 Com uma agulha de inoculação flambada e esfriada, colher um inóculo de cada cultura isolada no ágar MacConkey e transferi-lo para o meio EPM semeando toda a superfície do meio e a base com uma picada central até o fundo do tubo, e sem voltar a colônia, semear o meio de citrato de Simmons, através de uma estria única na superfície do

ágar.

5.5.3.5 Colher um novo inóculo da mesma colônia na placa de MacConkey e inocular o meio de MiLi com picada central até a base do tubo.

5.5.3.6 Incubar os meios EPM, MiLi e Citrato de Simmons a 37°C, durante 20-24 horas e proceder à leitura, considerando-se as diferentes reações de cada meio (ver itens 3.8 a 3.10).

5.5.3.7 Pesquisa da oxidase

A partir do crescimento no meio EPM, efetuar pesquisa da oxidase em placas de Petri estéreis, contendo papel de filtro Whatman nº 2 embebidos em solução a 1% de cloridrato N, N, N', N' - tetrametil-p-fenilenediamina. Com auxílio de uma alça de platina, flambada e esfriada, transferir um pequeno inóculo da cultura de 24 horas para a superfície do papel de filtro contendo o reagente para oxidase. As culturas oxidase-positivas são evidenciadas pelo desenvolvimento de coloração púrpura intensa em aproximadamente 30 segundos no local onde o papel foi tocado, enquanto as culturas oxidase-negativas não apresentam nenhuma reação no período de dois minutos de observação. Provas-contrôle negativo com E.coli e controle positivo com P.aeruginosa devem ser realizadas em paralelo.

5.5.3.8 Identificar as culturas oxidase-negativas, utilizando-se a Tabela, mediante os resultados obtidos nos meios EPM, MiLi e Citrato de Simmons.

5.5.3.9 Cada cultura identificada como E.coli é transferida para um tubo contendo ágar conservação, com auxílio de uma agulha de inoculação devidamente flambada e esfriada. A inoculação é feita através de picada em profundidade e estrias no ápice e os tubos são incubados a 35°C durante 24 horas.

5.5.3.10 A partir das culturas de E.coli estocadas em ágar conservação, proceder à detecção das E.coli enteropatogênica clássica, enteroinvasora e enterotoxigênica.

5.6 Detecção de E.coli enteropatogênica clássica

Nota: A detecção de E.coli enteropatogênica clássica é realizada através da determinação de antígenos somáticos (O), utilizando do soros hiperimunes polivalentes e monovalentes.

5.6.1 Semear na superfície de ágar conservação inclinado, as culturas de E.coli isoladas, utilizando uma agulha de inoculação flambada e esfriada, em estrias bem próximas, de forma a se obter um crescimen

TABELA - Diferenciação de enterobactérias por testes bioquímicos presentes no sistema simplificado: EPM, Mili e Citrato de Simmons - porcentagem de reações positivas (Fontes. C.F., 1979)

T E S T E S	SALMONELLA			CITROBACTER			KLEBSIELLA			ENTEROBACTER			SERRATIA			PROTEUS			PROVIDENCIA			YERSINIA				
	Edwardsiella tarda	cholera-suis	typhi	enteritidis	Arizona hirschawii	freundii	diversus	pneumoniae	ozaenae	rhinoschleromatis	cloacae	aerogenes	hafniae	agglumerans	marcescens	liquefaciens	rubidaea	vulgaris	mirabilis	morganii	retgerii	alcalifaciens	stuartii	pestis	enterocolitica	pseudotuberculosis
ácido	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
gás	92	2,1	99,2	99,3	99,3	90,9	97,3	96	55,5	0	99,3	95,9	98,9	21,1	52,6	72,5	35 ^M	86	95,4	84,9	12,2	82,5	0	0	0	0
H ₂ S	1,0	0	99,6	98,7	98,7	81,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	94,7	94,2	0	0	0	0	0	0	0
Urease	0	0	0	0	0	69,4	85,8	95,4	14,8	0	74,6	5	6,6	27,8	39,7	3,7	4	94,7	88,4	97,1	100	0	0	0	90,7	100
FA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27,9	0	0,9	0	100	99,6	95	98	97,4	94,5	0	0	0
Motilidade	62,1	0	98	94	100	95,7	92,9	0	0	0	92,4	91,7	93	89,4	98,6	92,7	88	94,7	95,1	84	94,4	96,2	85,5	0	0	0
Indol	96,3	37,8	99	0	1,2	6,7	100	6,8	0	0	0,8	0	0	18,7	0,1	1,8	2	91,4	3,2	99,5	95,9	99,4	98,6	0	26,7	0
Citrato	0,2	0	0	99,3	98,7	90,4	99,7	96,8	28,1	0	98,9	92,6	5,6	66,6	97,6	93,6	88	10,5	58,7	0	95,6	97,9	95,6	0	0	0
Lisina	89,6	0	100	94,9	99,4	0	0	97,2	35,8	0	0	97,5	99,6	0	64,2	61	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lactose	91,6	0,3	0	0,9	69,8	39,3	40,3	98,7	26,2	6	76,3	92,5	2,8	40,5	1,3	15,6	100	0	1,5	10	8,9	0,3	3,6	0	0	0

FA - Fenilalanina desaminase

w - reação fracamente positiva

to confluyente e homogêneo. Incubar durante 24 horas a 35°C.

5.6.2 Ressuspender o crescimento em 0,3 mL de solução fisiológica. Com auxílio de uma pipeta de 0,1 mL transferir 3 gotas pequenas da suspensão bacteriana espessa para uma placa de aglutinação e adicionar a cada uma, respectivamente, uma gota dos soros polivalentes clássicos A, B, C. Homogeneizar os soros com a suspensão bacteriana, usando palitos estéreis e fazendo movimentos circulares durante 2 a 3 minutos.

5.6.3 Considerar positivas as culturas que apresentaram soroglutinação intensa (3 a 4 cruces) dentro de 2 minutos de homogeneização.

5.6.4 Usando o mesmo procedimento descrito em 6.5.2 e 6.5.3, proceder ao teste com os soros monovalentes correspondentes a cada pool.

5.6.5 As amostras positivas no teste em lâmina devem ser submetidas à soroglutinação em tubo para determinação do título da reação, conforme descrito abaixo.

5.6.5.1 Semear as culturas de E.coli positivas no teste de aglutinação em lâminas, na superfície de base ágar sangue, utilizando uma agulha de inoculação flambada e esfriada, em estrias bem próximas, de forma a se obter um crescimento confluyente e homogêneo. Incubar durante 24 horas a 35°C.

5.6.5.2 Ressuspender o crescimento em 3 mL de solução fisiológica, e transferir essa suspensão para tubos estéreis de 18 mm x 180 mm e submeter a vapor fluente (100°C) por 1 hora⁵.

5.6.5.3 Diluir a suspensão bacteriana em solução salina formulada a 0,6%, até ser obtida uma turvação correspondente ao tubo 3 da escala de McFARLAND.

5.6.5.4 Diluir os soros monoespecíficos na razão 1:2, de forma a se obter um volume total de 0,5 mL. Para isso, proceder da seguinte forma:

- a) identificar tubos de 12 mm x 120 mm com as diluições:
1:20; 1:40; 1:80; 1:160; 1:320; 1:640; 1:1280; 1:2560;
1:5120; 1:10240; 1:20480;
- b) pipetar 0,5 mL de solução salina fenicada em todos os tubos, exceto no de diluição 1:20;
- c) neste, pipetar 0,05 mL do soromonoespecífico e 0,95 mL de

5. As culturas que se apresentaram rugosas, após aquecimento, devem ser desprezadas.

solução salina fenicada;

- d) transferir, com auxílio de uma pipeta de 1 mL, 0,5 mL da diluição 1:20 para o tubo 1:40;
- e) homogeneizar bem com a própria pipeta e transferir 0,5 mL da diluição 1:40 para o tubo 1:80;
- f) proceder desta forma sucessivamente até diluição 1:20480;
- g) desprezar 0,5 mL desta última diluição.

5.6.5.5 Acrescentar, a cada tubo das diferentes diluições, 0,5 mL do antígeno preparado acima (5.6.5.3).

Nota: Efetuar em paralelo um tubo controle contendo 0,5 mL de solução de antígeno (item 5.6.5.3) e 0,5 mL de solução salina fenicada a 0,5%.

5.6.5.6 Agitar os tubos, cobrir com papel alumínio e incubar em banho-maria a 48°C por 24 horas.

5.6.5.7 Efetuar a leitura dos tubos verificando a intensidade da soroaglutinação (1 a 4 cruces), sendo consideradas positivas as amostras que apresentaram 3 a 4 cruces e título ao redor de 1:500.

Nota: Para melhor caracterização das E.coli enteropatogênicas clássicas e invasoras, deve-se realizar a determinação do antígeno flagelar das mesmas, uma vez que somente alguns sorotipos específicos estão associados a gastroenterites humanas. Uma vez que estes soros não estão disponíveis no mercado, as cepas devem ser enviadas a Centros de Referência, para sorotipagem.

5.7 Detecção de E.coli enteroinvasora

Nota: A detecção de E.coli enteroinvasora é realizada também através da determinação de antígenos somáticos (O), utilizando soros hiperimunes polivalentes e monovalentes.

5.7.1 Selecionar as culturas E.coli caracterizadas bioquimicamente como imóveis e não produtoras de L-lisina descarboxilase.

5.7.2 Proceder à soroaglutinação em lâmina e a titulação em tubo, conforme descrito nos itens 5.6.1 a 5.6.5.7, utilizando os soros polivalentes A e B para E.coli enteroinvasora e seus respectivos monovalentes.

5.7.3 As culturas de E.coli móveis e não produtoras de L-lisina descarboxilase devem ser testadas diretamente frente ao sorotipo invasor O124, utilizando-se, respectivamente, a soroaglutinação em lâmina e em tubo, conforme descrito nos itens 5.6.1 a 5.6.5.7.

5.7.4 Os sorotipos identificados como invasores devem ser enviados a Centros de Referência para confirmação do fator de virulência através do teste de Sereny (TRABULSI, 1965) ou ensaio com células HeLLa.

5.8 Detecção de E.coli enterotoxigênica

Nota: A detecção de E.coli enterotoxigênica é realizada através da verificação da produção de enterotoxinas termolábil (LT) e term estável (ST).

5.8.1 Técnica de extração das enterotoxinas LT e ST

5.8.1.1 Distribuir, com assepsia e auxílio de uma pipeta de 10 mL, volumes de 2 mL do meio de Evans em tubos de ensaio de 15 mm x 120 mm. Incubar durante 18 horas a 35°C, sob agitação mecânica.

5.8.1.2 Após esse período de incubação, transferir cada cultura para um tubo de ensaio de 12 mm x 150 mm estéril e centrifugar a 3 000 rpm por 20 minutos, sob refrigeração (5°C).

5.8.1.3 Coletar os sobrenadantes cuidadosamente em flaconetes estéreis e testar quanto à presença de enterotoxina LT e ST.

Nota: Na impossibilidade de testar o extrato imediatamente, estes podem ser mantidos a 20°C, negativos por até 3 meses.

5.8.2 Teste em cultura de células Y-1 de adrenal de camundongo para detecção de enterotoxina LT.

Nota: As células Y-1, originárias de tumor de adrenal de camundongo, são cultivadas em frascos com 44 cm² de superfície contendo 25 mL do meio F-10, suplementado com 15% (V/V) de soro fetal bovino e 10 µg/mL de gentamicina.

5.8.2.1 Manutenção e subcultivo da linhagem celular Y-1:

- a) fazer assepsia do bocal do frasco de cultura e da rolha, passando uma gaze umedecida em álcool etílico a 70% e flambar;
- b) transferir o meio de cultura para um frasco tipo erlenmeyer de vidro neutro estéril;
- c) adicionar 5 mL de solução de tripsina-EDTA ao frasco e banhá-lo internamente como o mesmo;
- d) repousar o frasco em posição horizontal, deixando que a tripsina-EDTA atue sob a camada celular aderida à parede do frasco durante aproximadamente 2 minutos;
- e) remover a tripsina-EDTA que foi utilizada e adicionar no

vamente 2,5 mL de tripsina-EDTA sobre a cultura para que ocorra o descolamento celular;

- f) após 10-15 minutos, agitar cuidadosamente o frasco que está em processo de tripsinização para auxiliar o descolamento das células;
- g) homogeneizar as células descoladas, pipetando sobre a cultura celular descolada 5 mL de meio F-10 suplementado com 15% v/v de soro fetal bovino e 10 µg/mL de gentamicina;
- h) transferir 25 mL da suspensão celular para um novo frasco contendo 25 mL do meio F-10 suplementado com 15% v/v de soro fetal bovino e 10 µg/mL de gentamicina;
- i) homogeneizar a suspensão total com pipeta, cuidadosamente para evitar a formação de espuma;
- j) após homogeneização, efetuar novamente a assepsia com álcool 70% e/ou flambagem da boca do frasco de cultura e arrolhar o frasco com rolha nova; e
- l) incubar a 35°C para que haja adesão das células ao vidro e as mesmas iniciem a multiplicação até formarem uma monocamada, o que geralmente ocorre em 3-4 dias.

A relação da divisão para o repique da cultura celular é a seguinte:

- a partir de um frasco de cultura (semente) com área de aproximadamente 44 cm², ao se efetuar o repique a suspensão celular deverá ser dividida para dois frascos novos, para serem obtidas monocamadas confluentes em aproximadamente 4 dias.

5.8.2.2 Preparo das microplacas:

- a) preparar a suspensão de células conforme descrito no item 5.8.2.1-a a 5.8.2.1-e;
- b) ressuspender os 5 mL de suspensão celular em 40 a 50 mL do meio F-10 suplementado com 15% de soro fetal bovino e 10 µg/mL de gentamicina;
- c) inocular 0,25 mL dessa solução em cada uma das 96 câmaras de placas de microtitulação de fundo chato;
- d) incubar as placas por 48 horas a 35°C, em atmosfera com 5% de CO₂.

5.8.2.3 Fases executivas do ensaio:

- a) inocular volumes em duplicata de 0,025 mL dos extratos de

- culturas (obtidos conforme item 5.8.1) nos orifícios da placa contendo monocamada completa de células Y-1;
- b) incubar a 35°C por 24 horas em atmosfera com 5% de CO₂;
 - c) efetuar leituras em microscópio invertido, após 6 a 24 horas de incubação;
 - d) as amostras positivas para enterotoxina LT alteram a forma originalmente alongada (fibroblástica) das células para a forma arredondada;
 - e) controles positivo e negativo, utilizando-se respectivamente sobrenadantes das amostras TR69/1 (LT⁺/ST⁺) e TR302/4 (LT⁻/ST⁻), bem como controle do meio e das células, devem ser realizadas em cada placa.

Nota: Os orifícios da parte mais externa da placa não devem ser utilizados para inoculação, devido à ligeira alteração do pH do meio que ocorre nos mesmos.

5.8.3 Teste de Dean para detecção de enterotoxina ST

5.8.3.1 Adicionar 1 gota da solução de Evans a 2% em PSB a 1 mL do extrato da cultura.

5.8.3.2 Injetar, por via gástrica, 0,1 mL dessa mistura em 3 camundongos recém-nascidos (3 a 4 dias), logo após a amamentação.

5.8.3.3 Colocar os camundongos em um béquer de 20 mL e deixar à temperatura ambiente por 4 horas.

5.8.3.4 Sacrificar os animais, colocando um algodão embebido em éter no erlenmeyer e tampar com uma tampa de placa de Petri.

5.8.3.5 Abrir a região abdominal com auxílio de uma pinça cirúrgica e remover os intestinos.

5.8.3.6 Pesar os intestinos e carcaças dos animais separadamente e calcular a relação peso do intestino/peso da carcaça.

5.8.3.7 Considerar positiva a amostra que apresentar relação média peso do intestino/peso da carcaça igual ou superior a 0,083.

5.8.3.8 Controles positivo e negativo utilizando-se respectivamente sobrenadantes das amostras TR69/1 (LT⁺/ST⁺) e TR302/4 (LT⁻/ST⁻), devem ser realizados paralelamente ao ensaio.

Nota: A caracterização dos sorogrupos mais freqüentes de E.coli enterotoxigênica, se desejada, pode ser realizada empregando os antisoros polivalentes e respectivos monovalentes: I (025, 062

078), II (08, 015, 060), III (06, 020, 063) e IV (0128ac, 0139, 0148), através da técnica de soroaglutinação em lâmina e em tubo, de acordo com o descrito nos itens 5.6.1 a 5.6.5.7.

6 RESULTADOS

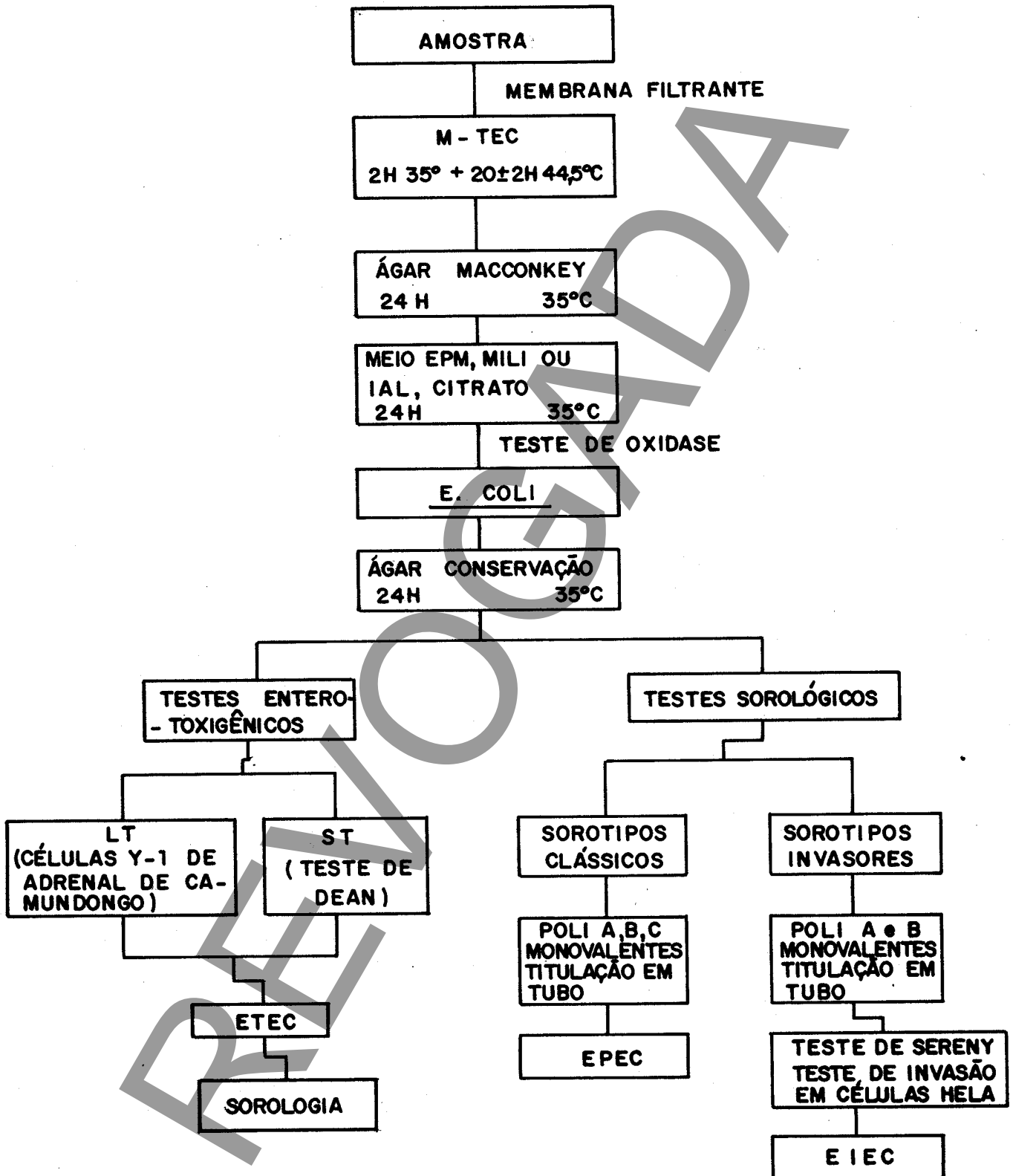
Relatar o resultado como: ausência ou presença de E.coli enteropatogênica, especificando a categoria: E.coli enteropatogênica clássica, E.coli enteroinvasora e E.coli enterotoxigênica, e o sorotipo identificado.

/ANEXO A

REVOGADO

REVOGADA

ANEXO A - ESQUEMA DE PROCEDIMENTO



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 a sobrevivência e crescimento de microrganismos. É recomendável a avaliação periódica de sua qualidade, através da realização de ensaios específicos. Ver Norma CETESB L5.215.

B-3 Controle de qualidade de meios de cultura

É recomendável a realização de testes específicos para avaliação e controle dos meios de cultura a serem empregados no ensaio para de terminação de E.coli pela técnica de membrana filtrante. Ver Norma CETESB L5.216.

B-4 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, 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 de tinta empregada na impressão do quadriculado em sua superfície superior e com o próprio material empregado em sua confecção.

B-4.1 Poros

Os poros da membrana filtrante devem ser uniformes em diâmetro e apresentar-se uniformemente distribuídos. Poros com diâmetro irregular determinam diferenças nas velocidades 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 superior, pois qualquer célula bacteriana retida em tais áreas não se desenvolverá por falta de nutrientes.

B-4.2 Tipo de tinta empregada na impressão do quadriculado

Algumas tintas utilizadas para essa finalidade tem 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 ao 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 mesma 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, proporcionando o crescimento confluyente nos canais que se formam. Portanto, as membranas filtrantes para uso microbiológico devem apresentar capacidade de retenção de bactérias certificada pelo fabricante e velocidade de filtração satisfatória e uniforme em toda sua área; devem ser resistentes ao uso, não devem apresentar áreas hidrofóbicas e a impressão do sistema quadriculado em sua superfície deve ser feita com tinta que não estimule ou iniba o desenvolvimento normal das colônias. Além disso, 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 físicas com o decorrer do tempo, determinando perda de flexibilidade, havendo ruptura da membrana nos pontos de pressão criados durante a manipulação; além disto, durante a filtração, frequentemente ocorre curvatura das bordas da membrana, impedindo o contato com o substrato.

B-5 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 esse período de tempo, 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 não uniformidade na velocidade de filtração em toda a 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 da 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 às membranas esterilizadas por exposição a óxido de etileno, sugerindo a presença de resíduos tóxicos nas membranas esterilizadas por esse último método. Nesse 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 autoclavados 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 no laboratório.

B-6 Controle da eficiência da autoclave

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

B-7 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 porta-filtros, entre cada série de 30 amostras filtradas no mesmo porta-filtro, deve-se dar preferência à sua esterilização por exposição à radiação ultravioleta.

B-8 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.

REVOGADA

ANEXO C - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- C-1 AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Microbiological examination of water. In: Standard methods for the examination of water and wastewater. 17 ed., Washington, APHA, AWWA, WPCF, 1989, p.i. 9-1 9.227.
- C-2 CETESB. Controle de qualidade de meios de cultura. São Paulo, 1987 (Norma Técnica L5.216).
- C-3 _____. E.coli - Determinação pela técnica de membrana filtran-tes, utilizando o meio m-TEC. São Paulo, 1991 (Norma Técnica L5.230).
- C-4 _____. Lavagem, preparo e esterilização de materiais em labora-tório de microbiologia. São Paulo, 1986 (Norma Técnica M1.001).
- C-5 _____. Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água, CETESB. São Paulo, 1988.
- C-6 _____. Preparo de culturas celulares para virologia. São Paulo, 1988 (Norma Técnica L5.501).
- C-7 _____. Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos. São Paulo, 1985 (Norma Técnica L5.215).
- C-8 DUFOUR, A.P. Escherichia coli: The fecal coliform. In: HOADLEY, A.W. & DUTKA, B.J. (ed.). Bacterial indicators/health hazards associated with water. Philadelphia. American Society for Testing and Materials, 1977, p: 48-58.
- C-9 DUFOUR, A.D.; STRICKLAND, E.R. & CABELLI, V.J. Membrane filter method for enumerating Escherichia coli. Applied and Environmental Microbiology, 41 (3): 1152-1158, 1981.
- C-10 EDWARDS, P.R. & EWING, W.H. Identification of Enterobacteria ceae 3rd ed. Minneapolis Burgess Publishing Co, 1972, 362p.
- C-11 EPA, Test method for Escherichia coli in water by membrane procedure: Method 1103,1. In: Test methods for Escherichia

coli and enterococci in water by the membrane filter procedure. Cincinnati, 1985, p. 1-14 (EPA-600/4-85/076).

- C-12 FONTES, C.F. Proposição de dois novos meios de cultura e de um sistema simplificado para identificação de enterobactérias. São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1979 (Tese de Mestrado).
- C-13 SATO, M.I.Z. Ocorrência de Escherichia coli enteropatogênica clássica, enteroinvasora e enterotoxigênica em amostras de água e esgoto do Estado de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1987 (Tese de Mestrado).
- C-14 TOLEDO, M.R.F.; FONTES, C.F. & TRABULSI, L. R. EPM - Uma modificação do meio Rugai e Araújo para realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H₂S, urease e triptofano-desaminase. Rev. Microbiol., 13 (4): 309-315, 1982.
- C-15 TRABULSI, L.R. Microbiologia. 1ª ed. Rio de Janeiro, Atheneu, 1986, 355p.
-