



# NORMA TÉCNICA

L5.520

Out/1986  
46 PÁGINAS

Cândida albicans - determinação pela técnica da membrana filtrante: 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](http://www.cetesb.sp.gov.br)

<p>NORMA CETESB</p>	<p><b>CANDIDA ALBICANS - DETERMINAÇÃO PELA TÉCNICA DA MEMBRANA FILTRANTE Método de Ensaio</b></p>	<p>L5.520 out/86</p>
-------------------------	---	--------------------------

## SUMÁRIO

	<u>Pág.</u>
Introdução .....	1
1 Objetivo .....	2
2 Normas complementares .....	2
3 Definições .....	3
4 Aparelhagem .....	4
5 Execução do ensaio .....	18
6 Resultados .....	29
Anexo A .....	33
Anexo B .....	35
Anexo C .....	39
Anexo D .....	45

## INTRODUÇÃO

Candida albicans, descrita originalmente em 1853, não é somente a espécie mais comum de Candida associada com doenças no homem, mas é também a mais patogênica. Esta levedura é constituinte normal da microflora saprofítica da boca, vagina e trato intestinal do homem, onde pode ser comumente isolada. Sob determinadas condições, tal como a baixa resistência do hospedeiro torna-se patogênica, sendo responsável por uma variedade de infecções micóticas superficiais (ulcerações da mucosa oral e vaginal, infecções da pele, principalmente interdigitais e infecções oculares) e infecções sistêmicas (broncomiose, endocardite, estomatite, etc).

Sua presença em águas doces, salobras e salgadas tem sido descrita por vários autores, entretanto existem poucos dados quantitativos relativos ao isolamento destas leveduras no ambiente aquático. Segundo dados da literatura raramente a Candida albicans tem sido isolada de águas não poluídas; presume-se, portanto, que esta levedura não faz parte da flora normal do habitat aquático, por ser incapaz de existir sem um hospedeiro e também não existem dados que sua reprodução ocorra em animais aquáticos. Portanto, sua pre

sença em águas naturais pode estar relacionada com o lançamento de despejos humanos não tratados, onde ocorrem em número elevado, ou pelo carreamento de fezes de animais e aves, do solo por águas de enxurradas. Assim, a presença de C. albicans em águas naturais pode ser considerada uma indicação de contaminação por fezes.

Por outro lado, a ocorrência de C. albicans em águas recreacionais tem sido diretamente associada com epidemias de candidíase entre banhistas. Brisou, J., em estudos realizados em 1975, verificou um aumento significativo dos casos de infecções vaginais causadas por Candida entre mulheres que frequentavam praias contaminadas por essa levedura, e recomendou que os programas de vigilância sanitária incluíssem o monitoramento sistemático de leveduras intestinais como evidência suplementar de poluição fecal. Assim, a C. albicans além do seu possível significado como um organismo indicador de poluição, pode também ser considerada um risco em potencial à saúde humana quando presente em águas recreacionais (piscinas, praias, represas, etc).

## 1 OBJETIVO

1.1 Esta Norma prescreve o método para quantificação de Candida albicans pela técnica de membrana filtrante, utilizado para:

- a) avaliação da eficiência do tratamento de águas de piscinas;
- b) avaliação da qualidade de águas recreacionais, inclusive águas marinhas;
- c) avaliação da qualidade de corpos d'água receptores de despejos industriais, domésticos e hospitalares;
- d) caracterização da origem fecal quando aplicada em conjunto com a determinação de coliformes fecais.

## 2 NORMAS COMPLEMENTARES

Na aplicação desta Norma é necessário consultar:

- a) M1.001 - Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratório de microbiologia;
- b) L5.215 - Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos;
- c) L5.216 - Controle de qualidade de meios de cultura;
- d) Guia de orientação para coleta e preservação de amostras (CETESB).

### 3 DEFINIÇÕES

Para os efeitos desta Norma são adotadas as definições de 3.1 a 3.13.

#### 3.1 Candida albicans

Levedura patogênica pertencente ao gênero Candida. Apresenta células brotantes (blastósporos) redondas, ovóides ou alongadas, com diâmetro de (3,5 - 6,0) x (6,0 - 10,0)  $\mu$ . Formam pseudomicélio em abundância, clamidósporos e algumas vezes micélio verdadeiro. Observa-se também na presença de soro a formação de tubo germinativo (comprimento máximo de aproximadamente 20  $\mu$ m). É resistente a ciclohexamida, se reproduz assexuadamente por brotamento multipolar e apresenta metabolismo fermentativo para alguns carboidratos. Cresce a temperatura de 25 a 37°C por um período de 48 a 72 horas.

#### 3.2 Fungos

São protistas superiores que produzem esporos, não possuem clorofila e são incapazes de sintetizar seus alimentos. Conseqüentemente, dependem de outros organismos para completar a sua nutrição. Podem viver em matéria orgânica já morta causando e/ou auxiliando sua decomposição. Podem parasitar outros seres vivos, alimentando-se do protoplasma das células hospedeiras e também formar associações com outras plantas, como as algas ou com raízes de vegetais superiores. São subdivididos em bolores e leveduras.

#### 3.3 Levedura

Fungo cuja forma de desenvolvimento normal e dominante é unicelular e não filamentosa; ocorrem com freqüência em locais ricos em substâncias fermentáveis.

#### 3.4 Esporo

Órgão de reprodução dos fungos, pode ser sexuado ou assexuado, sendo de grande importância na classificação do fungo.

#### 3.5 Hifa

Cada filamento que constitui o micélio ou talo pluricelular.

#### 3.6 Micélio ou talo pluricelular

Conjunto de filamentos (hifas) que se desenvolvem a partir de um esporo e constituem o corpo do fungo. Pode ser filamento contínuo ou tabicado.

### 3.7 Brotamento

Processo de multiplicação assexuada que se traduz pela formação de brotos.

### 3.8 Blastósporo

Esporo assexuado originado por brotamento ou germinação.

### 3.9 Clamidósporo

Esporo assexuado de resistência, consituído de paredes grossas e protoplasma denso que nascem do filamento.

### 3.10 Pseudomicélio

Crescimento de falsa filamentação, produzida por causa do alargamento dos brotos, característico em certas espécies de fungos leveduriformes quando se desenvolvem em condições determinadas.

### 3.11 p.a.

Para análise.

### 3.12 EDTA

Ácido etilenodiaminotetracético.

### 3.13 N.C. MF/500 ml

Número de colônias por 500 ml (Membrana Filtrante).

## 4 APARELHAGEM

### 4.1 Materiais e equipamentos

#### 4.1.1 Estufa para esterilização e secagem

A estufa deve acondicionar pipetas, placas de Petri, frascos para coleta e toda vidraria e aparelhagem que pode ser esterilizada por calor seco, e ter capacidade suficiente para permitir a circulação do ar quente ao redor do material a ser esterilizado. Deve ser equipada com um termômetro e um termostato e operar normalmente a uma temperatura de 170 a 180°C. O tempo de esterilização para a maior parte da vidraria é de 2 horas, à temperatura de 170 a 180°C.

#### 4.1.2 Autoclave

Deve ter tamanho suficiente para permitir a circulação do vapor ao

redor do material a ser esterilizado por esse método e ser equipada com válvula de segurança, com um manômetro e com um termômetro, cujo bulbo ficará na direção da linha de escape do vapor condensado (dreno). A autoclave é normalmente operada a uma pressão de vapor de 15 libras por polegada quadrada, produzindo, em seu interior, uma temperatura de  $121,6^{\circ}\text{C}$  ao nível do mar. Deve-se observar, em seu funcionamento, a substituição por vapor de todo o ar existente na câmara. A operação total de uma autoclave deve durar no máximo uma hora, sendo recomendado o acompanhamento dos ciclos de operação e os registros de tempo-temperatura. É recomendável que a autoclave atinja a temperatura de esterilização de  $121^{\circ}\text{C}$  em 30 minutos e mantenha essa temperatura durante o período de esterilização.

#### 4.1.3 Incubadoras bacteriológicas

Devem ser equipadas com termostato e projetadas de tal forma que a temperatura em todas as partes utilizadas seja a requerida para os testes ( $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  e  $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ). Devem ter capacidade suficiente para permitir a circulação do ar ao redor de todas as culturas, quando o material de trabalho estiver sendo incubado. Para verificar a temperatura de uma incubadora grande, devem ser colocados um ou mais termômetros, com o bulbo submerso em água, glicerina ou óleo mineral, em lugares representativos da câmara e feitos registros periódicos da temperatura. As incubadoras deverão manter 75 a 85% de umidade relativa e serem colocadas em local onde a temperatura permaneça na faixa de 16 a  $27^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.1.4 Banho-maria

Equipado com termostato para temperatura de  $55^{\circ}\text{C}$ , com capacidade suficiente para comportar recipientes contendo meios de cultura, cuja temperatura deve ser estabilizada antes de sua distribuição em placas de Petri.

#### 4.1.5 Destilador de água ou aparelho para desionização

Deve produzir água não tóxica, livre de substâncias que impeçam ou interfiram na multiplicação bacteriana.

#### 4.1.6 Potenciômetro

Deve ter escala bem legível e medir com precisão mínima de 0,1 unidade de pH. A calibração do potenciômetro deve ser feita pelo menos duas vezes ao dia, com tampões de  $\text{pH} = 4,0$ ,  $\text{pH} = 6,86$  e  $\text{pH} = 9,18$ .

#### 4.1.7 Balança

Com sensibilidade mínima de 0,1 g ao pesar 150 g.

#### 4.1.8 Equipamento para filtração

##### 4.1.8.1 Fonte de vácuo

Bomba de vácuo ou outro dispositivo conveniente para produzir uma pressão diferencial no porta-filtro.

##### 4.1.8.2 Frasco de filtração

Frasco Kitassato, de parede espessa, com capacidade de 4 000 ml.

##### 4.1.8.3 Porta-filtros (ver Figura 1)

De vidro, plástico autoclavável ou aço inoxidável. Podem ser acoplados diretamente ao frasco de filtração ou a suportes especiais (para vários porta-filtros); neste caso, os suportes são conectados ao frasco de filtração através de tubo de polietileno ou tubo de latex de espessura adequada.

##### 4.1.8.4 Frasco de proteção

Frasco Kitassato de parede espessa, usualmente de 1 litro, conectado ao frasco de filtração e à fonte de vácuo através de tubo de polietileno ou tubo de látex de espessura adequada. Sua finalidade é prevenir que a fonte de vácuo seja atingida pela água acumulada no frasco de filtração.

#### 4.1.9 Microscópio estereoscópico binocular

Com ampliação para 10 a 15 diâmetros. É recomendada a utilização de uma lâmpada de luz fluorescente branca (fria), adaptada em suporte adequado que permita sua colocação acima da membrana em que será efetuada a contagem de colônias.

#### 4.1.10 Refrigerador

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

#### 4.1.11 Materiais para preparação de meios de cultura

Recipientes de vidro ou aço inoxidável. O material de aquecimento e os bastões devem estar limpos e isentos de qualquer substância tóxica (nunca devem ser de cobre).

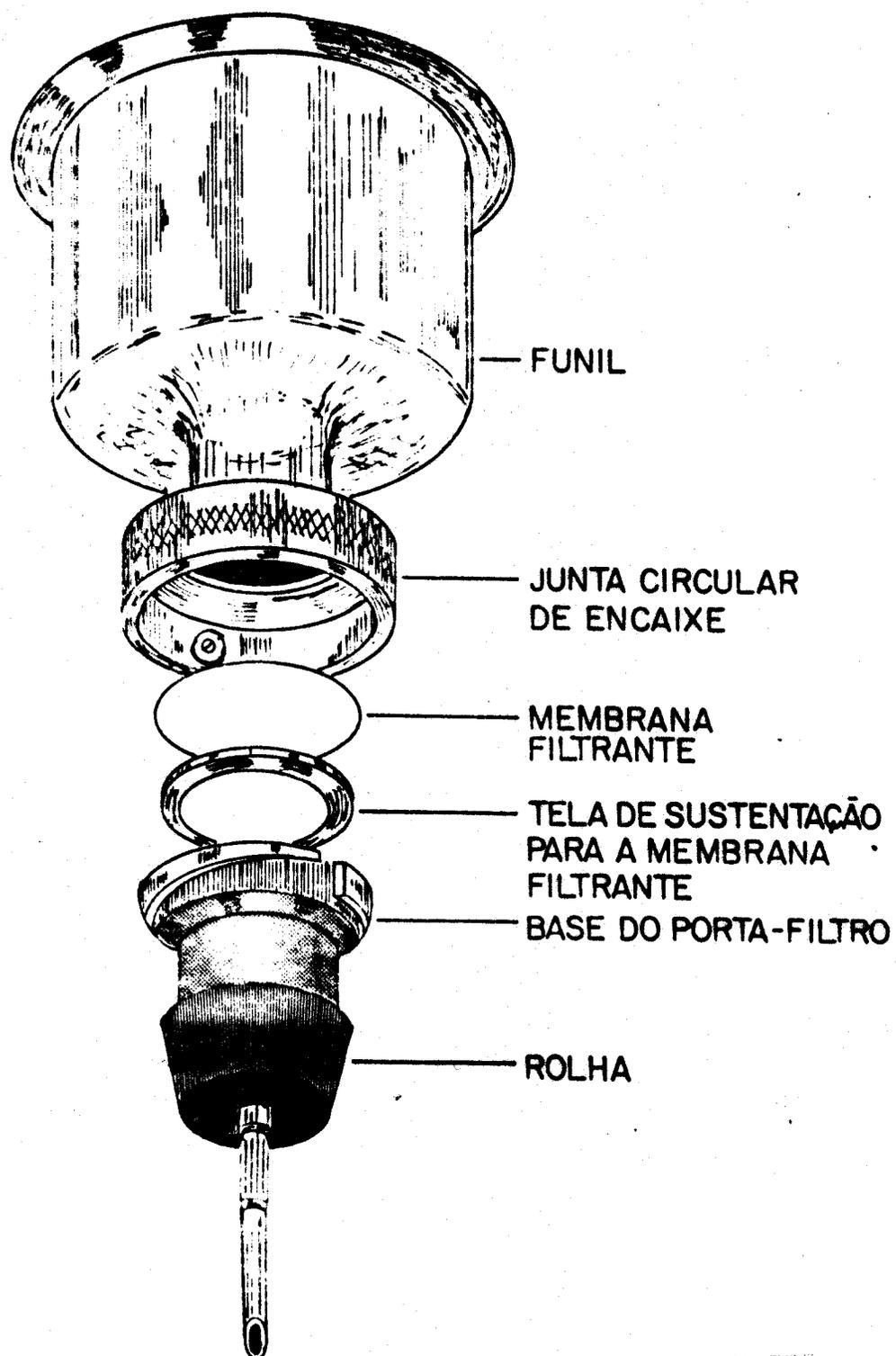


FIGURA 1 - Unidade de filtração (porta-filtro)

#### 4.1.12 Frascos para coleta de amostras

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

#### 4.1.13 Frascos para água de diluição

De borossilicato (pyrex) ou vidro neutro, com tampas de roscas que permitam boa vedação e sejam livres de substâncias tóxicas solúveis, com capacidade para conter  $90 \pm 2$  mL de água de diluição, deixando um espaço suficiente para permitir uma boa homogeneização quando se efetuar a agitação.

#### 4.1.14 Pipetas

Pipetas tipo Mohr de 1 mL, 5 mL e 10 mL, com graduação de 1/10 e erro de calibração inferior a 2,5%, e com bocal para tampão de algodão. São guardadas em caixas de aço inoxidável, podendo também ser embrulhadas individualmente em papel. São esterilizadas por calor seco a 170-180°C, durante duas horas.

#### 4.1.15 Provetas graduadas de 100 mL ou porta-filtros graduados com marcação externa

#### 4.1.16 Balões

Devem ser de borossilicato ou vidro neutro, com capacidade para conter a água de diluição a ser utilizada no enxague dos porta-filtros, durante a filtração das amostras.

#### 4.1.17 Placas de Petri de vidro

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.

#### 4.1.18 Placas de Petri de plástico

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

#### 4.1.19 Alças de inoculação

De platina, platina-irídio ou níquel-cromo, com 7 a 8 cm de comprimento e 0,5 mm de diâmetro, apresentando na extremidade uma parte encurvada, formando um aro com diâmetro mínimo de 3 mm; com cabo de metal (cabo de Kolle).

#### 4.1.20 Membranas filtrantes estéreis

De 47 mm de diâmetro, com porosidade de 1,2  $\mu$ m, brancas quadriculadas.

#### 4.1.21 Porta-pipetas de aço inoxidável

#### 4.1.22 Caixas de aço inoxidável

Com dimensões de 50 cm x 30 cm x 20 cm.

#### 4.1.23 Pinças

De aço inoxidável com extremidades arredondadas.

#### 4.1.24 Estantes

Para tubos de ensaio de 16 mm x 150 mm, podendo ser de arame galvanizado, (para utilização em incubadoras) ou de aço inoxidável ou arame galvanizado plastificado (para utilização em banhos-maria).

#### 4.1.25 Bico de Bunsen

#### 4.1.26 Tripé

#### 4.1.27 Tela de amianto

De tamanho 22 x 22 cm.

### 4.2 Reagentes

4.2.1 Para a preparação dos meios de cultura e soluções utilizadas nesse ensaio, são os seguintes os reagentes necessários:

- . Ácido fênico;
- . Ácido láctico;
- . Ácido sulfúrico;
- . Agar;
- . Base nitrogênio levedura "Yeast Nitrogen Base";
- . Batata;
- . Casitone;
- . Ciclohexamida;
- . Citrato de amônio e bismuto;
- . Cloranfenicol;
- . Cloreto de bário ( $\text{BaCl}_2$ ) p.a.;
- . Cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) p.a.;
- . "Cotton blue";
- . Dextrose;
- . EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) p.a.;
- . Extrato de levedura;
- . Fosfato monopotássico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) p.a.;
- . Fubá;
- . Glicerina;

- . Glicina;
- . Hidróxido de sódio (NaOH) p.a.;
- . Infusão de coração;
- . Maltose;
- . Neopeptona;
- . Púrpura de bromocresol;
- . Sulfato de amônio  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  p.a.;
- . Sulfato de magnésio  $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$  p.a.;
- . Sulfito de sódio;
- . Tiosulfato de sódio  $(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)$  p.a.;
- . Tween 80.

4.2.2 Os reagentes devem ser de grau bacteriológico e de procedência idônea, apresentar odor, cor e consistência inalteradas, ser livres de elementos bactericidas ou bacteriostáticos inespecíficos bem como de carboidratos inespecíficos.

#### 4.3 Meios de cultura

##### 4.3.1 Meio M.C.A.

###### Fórmula:

Solução 1 .....	100 mL
Solução 2 .....	1000 mL
pH final após esterilização: $6,7 \pm 0,1$	

Preparo: Este meio deve ser preparado como segue:

- a) preparar a solução 1, com a seguinte composição:
- |                                |        |
|--------------------------------|--------|
| Base nitrogênio levedura ..... | 6,7 g  |
| Água destilada .....           | 100 mL |

Para o preparo dessa solução, pesar 6,7 g do meio desidratado "Yeast Nitrogen Base" e acrescentar 100 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 por filtração em membrana de  $0,20 \mu\text{m}$ . Após a esterilização, manter a solução preparada em banho-maria a  $55^\circ\text{C}$ , para estabilização da temperatura, até o momento da sua adição à solução 2.

- b) Preparar a solução 2, com a seguinte composição:
- |                                   |        |
|-----------------------------------|--------|
| Glicina .....                     | 10,0 g |
| Maltose .....                     | 30,0 g |
| Citrato de amônia e bismuto ..... | 5,0 g  |

Sulfito de sódio .....	3,0 g
Cloranfenicol .....	0,5 g
Ciclohexamida .....	1,5 g
Agar .....	10,0 g
Água destilada .....	900 mL

Para o preparo dessa solução, pesar os ingredientes, com exceção do agar, e acrescentar 900 mL de água destilada fria. Aquecer agitando freqüentemente até a completa dissolução dos ingredientes, tomando o cuidado para não atingir a temperatura de ebulição. Ajustar o pH para 7,1. Adicionar a esta solução o agar. Aquecer, agitando freqüentemente, até a completa fusão do agar, deixando atingir o ponto de ebulição por 1 minuto. Colocar em banho-maria a 55°C para estabilização da temperatura do meio de cultura preparado.

- c) Juntar as soluções 1 e 2. Ajustar o pH para  $6,7 \pm 0,1$  e com todos os cuidados de assepsia, distribuir volumes de 3 mL em placas de Petri de plástico de 48 mm x 8,5 mm, previamente esterilizadas.
- d) As placas de Petri, contendo o meio preparado, podem ser armazenadas sob refrigeração (2 a 8°C) durante um período máximo de 2 semanas.

#### 4.3.2 Agar Sabouraud Dextrose

##### Fórmula:

Dextrose .....	40,0 g
Neopeptona .....	10,0 g
Agar .....	15,0 g
Água destilada .....	1000 mL
pH final após esterilização: $5,6 \pm 0,1$	

##### Preparo:

Para o preparo desse meio, pesar 65,0 g do meio desidratado "Sabouraud Dextrose Agar" e acrescentar 1000 mL de água destilada fria. Deixar em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Ajustar o pH para 5,6.

Distribuição: Este meio deve ser distribuído como segue:

- a) distribuição em placas - Esterilizar o meio em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Após a esterilização, manter a solução

preparada em banho-maria a 55°C, para estabilização da temperatura. Com todos os cuidados de assepsia, distribuir volumes de aproximadamente 20 ml em placas de Petri de 15 mm x 100 mm, previamente esterilizadas. As placas de Petri, contendo o agar Sabouraud dextrose, podem ser armazenadas sob refrigeração (2 a 8°C), durante um período máximo de 4 semanas.

- b) distribuição em tubos - Distribuir, com todos os cuidados de assepsia, volumes de aproximadamente 17 mL do agar Sabouraud dextrose em tubos de 18 mm x 180 mm. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Após a autoclavação, os tubos contendo o meio devem ser inclinados até a sua solidificação, depois podem ser armazenados sob refrigeração (2 a 8°C), durante um período máximo de 4 semanas.

#### 4.3.3 Agar Sabouraud Dextrose com Cloranfenicol e Ciclohexamida

##### Fórmula:

Neopeptona .....	10,0 g
Dextrose .....	40,0 g
Agar .....	15,0 g
Ciclohexamida .....	0,5 g
Cloranfenicol .....	0,05 g
Água destilada .....	1000 mL
pH final após esterilização: 7,0 ± 0,1	

##### Preparo:

Pesar os ingredientes e acrescentar 1000 mL de água destilada fria. Deixar em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer agitando frequentemente, até a completa dissolução dos ingredientes. Ajustar o pH para 7,0.

Distribuição: Este meio deve ser distribuído como segue:

- a) distribuição em placas - Esterilizar o meio em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Após a esterilização, manter a solução preparada em banho-maria a 55°C, para estabilização da temperatura. Com todos os cuidados de assepsia, distribuir volumes de aproximadamente 20 mL em placas de Petri de 15 mm x 100 mm, previamente esterilizadas. As placas de Petri, contendo o agar Sabouraud dextrose com cloranfenicol e ciclohexamida podem ser armazenadas sob refrigeração (2 a 8°C) durante um período máximo de 4 semanas.

- b) distribuição em tubos - Distribuir, com todos os cuidados de as sepsia, volumes de aproximadamente 17 mL do agar Sabouraud dex trose com cloranfenicol e ciclohexamida em tubos de 18 mm x 180 mm. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Após a autoclavação, os tubos contendo o meio devem ser inclinados até a sua solidificação, depois podem ser armazenados sob refrigera-ção (2 a 8°C), durante um período máximo de 4 semanas.

#### 4.3.4 Agar fubá + Tween 80

##### Fórmula:

Fubá .....	40,0 g
Agar.....	10,0 g
Tween 80 .....	10 mL
Água destilada .....	1000 mL

Preparo: Este meio deve ser preparado como segue:

- a) pesar o fubá e acrescentar 500 mL de água destilada fria. Deixar em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer em banho-maria regulado a 60°C durante 30 minutos. Filtrar em papel de fil-tro com todos os cuidados de assepsia. Acrescentar 500 mL de água destilada fria, misturar bem e manter a solução em banho-maria a 55°C, para estabilização da temperatura, até o momento de sua adição à solução de agar.
- b) pesar o agar e acrescentar 50 mL de água destilada fervente. Homogeneizar até a completa dissolução do agar. Após a homogenei-zação, colocar em banho-maria a 55°C para a estabilização da temperatura da solução preparada.
- c) juntar a solução de fubá com a solução de agar e acrescentar Tween 80, com todos os cuidados de assepsia, distribuir volumes de aproximadamente 20 mL em tubos de 18 mm x 180 mm. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Após a autoclavação, os tubos contendo o meio preparado podem ser armazenados sob refrigeração (2 a 8°C), durante um período máximo de 4 semanas.

#### 4.3.5 Agar Batata Dextrose

##### Fórmula:

Batata (cozida) .....	250,0 g
Dextrose .....	20,0 g
Agar .....	20,0 g

Água destilada ..... 1000 mL  
 pH final após esterilização  $5,6 \pm 0,1$

Preparo:

Para o preparo dessa solução, pesar 250 g de batata, descascar, cortar e colocar em um becker. Adicionar 100 mL de água destilada fria e cozinhar por um período de 40 minutos. Filtrar em gase com todos os cuidados de assepsia. Adicionar ao filtrado a dextrose, o agar e completar o volume para 1000 mL com água destilada. Ajustar o pH para  $5,6 \pm 0,1$ . Distribuir volumes de aproximadamente 20 mL em tubos de 18 mm x 180 mm. Esterilizar em autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos. Após a autoclavação, os tubos contendo o meio preparado podem ser armazenados sob refrigeração ( $2$  a  $8^{\circ}\text{C}$ ) durante um período máximo de 4 semanas.

4.3.6 Meio Basal de Wickerham com Nitrogênio para estudo de fontes de carbono. (Wickerham N).

Fórmula:

Sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ p.a.....	5,0 g
Fosfato monopotássico $(\text{KH}_2\text{PO}_4)$ p.a.....	1,0 g
Sulfato de magnésio $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ p.a.....	0,5 g
Agar .....	15,0 g
Água destilada .....	1000 mL

Preparo:

Pesar os ingredientes e acrescentar 1000 mL de água destilada fria. Deixar em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer agitando freqüentemente, até a completa dissolução dos ingredientes. Distribuir volumes de aproximadamente 20 mL em tubos de 18 mm x 180 mm. Esterilizar em autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Após a autoclavação, os tubos contendo o meio preparado podem ser armazenados sob refrigeração ( $2$  a  $8^{\circ}\text{C}$ ) durante um período máximo de 4 semanas.

4.3.7 Meio Basal de Wickerham com Carbono para estudo de fontes de nitrogênio. (Wickerham C).

Fórmula:

Dextrose .....	20,0 g
Fosfato monopotássico $(\text{KH}_2\text{PO}_4)$ p.a.....	1,0 g
Sulfato de magnésio $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ p.a.....	0,5 g

Agar .....	15,0 g
Água destilada .....	1000 mL

Preparo:

Pesar os ingredientes e acrescentar 1000 mL de água destilada fria. Deixar em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer agitando freqüentemente, até a completa dissolução dos ingredientes. Distribuir volumes de aproximadamente 20 mL em tubos de 18 mm x 180 mm. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Após a autoclavação, os tubos contendo o meio preparado podem ser armazenados sob refrigeração (2 a 8°C) durante um período máximo de 4 semanas.

4.3.8 Meio para fermentação de açúcaresFórmula:

Caldo infusão de coração .....	25,0 g
Extrato de levedura .....	5,0 g
Casitone .....	4,0 g
Púrpura de bromocresol (0,04%) .....	15 mL
Água destilada .....	1000 mL
pH final após esterilização: 7,0	

Preparo:

Pesar os ingredientes e acrescentar 1000 mL de água destilada fria. Deixar em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer agitando freqüentemente, até a completa dissolução dos ingredientes. Ajustar o pH para 7,0. Distribuir volumes de 5,5 mL em tubos de ensaio 12 mm x 120 mm com tubos de Durham invertidos para que o volume final, após esterilização seja de 5 mL. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Os açúcares que serão utilizados deverão ser esterilizados por filtração em membrana com 0,22 µm de porosidade. Adicionar 2% (2 g do açúcar para 100 mL do meio) de cada açúcar esterilizado, com todos os cuidados de assepsia, ao seu respectivo tubo contendo a solução preparada. Os tubos contendo a base podem ser armazenados sob refrigeração (2 a 8°C) durante um período máximo de 4 semanas.

Nota: Somente quando for adicionada a rafinose a sua concentração deverá ser de 4% (4 g do açúcar para 100 mL do meio).

4.4 Soluções

#### 4.4.1 Água de diluição

##### Fórmula:

Solução estoque A .....	1,25 mL
Solução estoque B .....	5,00 mL
Água destilada .....	1000 mL
pH final após esterilização: $7,2 \pm 0,1$	

Preparo: A água de diluição deve ser preparada como segue:

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

Fosfato monopotássico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) p.a.....	34,0 g
Água destilada .....	1000 mL

Para esse preparo, dissolver o fosfato monopotássico em 500 mL de água destilada, ajustar o pH para  $7,2 \pm 0,1$  com solução de hidróxido de sódio 1N e completar o volume para 1 litro com água destilada. Distribuir volumes que sejam adequados à necessidade de uso do laboratório, em frascos com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a  $121^\circ\text{C}$ , durante 15 minutos. Armazenar em geladeira.

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

Cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) p.a.....	81,1 g
Água de diluição .....	1000 mL

Para o preparo dessa solução, dissolver o cloreto de magnésio em um litro de água destilada. Distribuir volumes que sejam adequados à necessidade de uso no laboratório, em frascos com tampa de rosca. Rotular e armazenar em geladeira.

c) adicionar 1,25 mL da solução estoque A e 5 mL da solução estoque B a 1 litro de água destilada.

d) distribuir, em frascos de diluição, quantidades adequadas que assegurem, após autoclavação a  $121^\circ\text{C}$  durante 15 minutos, volumes de  $90 \pm 2$  mL.

Nota: 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.

#### 4.4.2 Solução normal de hidróxido de sódio (NaOH-1N)

Fórmula:

Hidróxido de sódio (NaOH) p.a..... 40,0 g  
 Água destilada q.s.p..... 1000 mL

Preparo:

Pesar 40 g de hidróxido de sódio, colocar em um balão volumétrico e completar o volume para 1000 mL com água destilada. Homogeneizar bem até a completa dissolução do hidróxido de sódio.

4.4.3 Solução de tiosulfato de sódio a 1,8 %Fórmula:

Tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) p.a..... 18,0 g  
 Água destilada q.s.p..... 1000 mL

Preparo:

Pesar 18 g de tiosulfato de sódio e dissolver em 1000 mL de água destilada. Armazenar em frasco bem vedado. Ao serem preparados os frascos para coleta de amostras de águas tratadas, adicionar aos mesmos, antes de sua esterilização, 0,1 mL dessa solução para cada 100 mL da amostra a ser coletada.

4.4.4 Solução de EDTA a 15%Fórmula:

EDTA (ácido etilenodiaminotetracético)..... 150 g  
 Água destilada q.s.p..... 1000 mL

Preparo:

Pesar 150 g de EDTA e dissolver em 1000 mL de água destilada. Ajustar o pH para 6,5. Armazenar em frasco bem vedado. Ao serem preparados os frascos para coleta de amostras de águas suspeitas de conterem metais pesados, adicionar aos mesmos, antes de sua esterilização, 0,3 mL dessa solução para cada 100 mL da amostra a ser coletada.

Nota: Além da solução de EDTA, no volume especificado acima, deve ser adicionado aos frascos de coleta dessas amostras, 0,1 mL de uma solução de tiosulfato de sódio a 10% para cada 100 mL da amostra a ser coletada.

4.4.5 Solução de lactofenol Cotton Blue (Lactofenol de Amann)Fórmula:

Ácido fênico..... 20 g  
 Ácido láctico..... 20 mL  
 Glicerina..... 40 mL  
 Cotton blue (azul de algodão ou azul de  
 Porrier)..... 0,05 g  
 Água destilada..... 20 mL

### Preparo:

Para o preparo dessa solução, misturar 20 mL de ácido láctico, 40 mL de glicerina em 20 mL de água destilada fria. Adicionar o ácido fênico e aquecer a solução agitando frequentemente, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Adicionar o corante "cotton blue". Filtrar em papel. Armazenar em frasco bem vedado.

## 5 EXECUÇÃO DO ENSAIO

### 5.1 Princípio do método

O método baseia-se na filtração de volumes adequados de água através de membrana filtrante com porosidade de 1,2  $\mu\text{m}$ . As leveduras a serem detectadas, apresentando dimensões maiores, ficarão retidas na superfície da membrana, a qual é então transferida para uma placa de Petri contendo o meio de cultura seletivo e diferencial (meio MCA). Por capilaridade, o meio se difundirá para a membrana, entrando em contato com as leveduras e, após um período de incubação de 72 h a  $35 \pm 0,5$  °C se desenvolverão, na superfície da membrana, colônias com características típicas (colônias arredondadas, lisas e brilhantes de coloração marrom, com diâmetro aproximadamente de 1mm), que poderão ser observadas com auxílio de um microscópio estereoscópico. A partir da confirmação dessas colônias em microcultivo em lâmina e pesquisa de tubo germinativo, calcula-se a densidade da Candida albicans presente na amostra. Se necessário, realiza-se testes complementares (auxonograma e zimograma).

### 5.2 Reações

#### 5.2.1 Reações no meio MCA

Meio altamente seletivo, o ajuste do pH é fundamental para o desenvolvimento das colônias típicas, que possuem a coloração marrom devido a presença de citrato de amônio e bismuto e sulfito de sódio. São colônias arredondadas, lisas, brilhantes e com diâmetro de aproximadamente 1,0 mm.

#### 5.2.2 Auxonograma (prova de assimilação de carbono e nitrogênio)

A Candida albicans necessita para o seu metabolismo de determinadas fontes nutricionais (C e N), e estas são incorporadas ao meio mínimo e conseqüentemente assimiladas por essa levedura. Algumas fontes de carbono e nitrogênio assimiladas pela Candida albicans são: glicose, galactose, sacarose, maltose, trealose, D-xilose, amido solúvel e nitrato, não sendo assimiladas pela levedura a celobiose, lactose, melibiose, rafinose, etc.

### 5.2.3 Zimograma (prova de fermentação de açúcares)

A prova de fermentação baseia-se na capacidade das leveduras de decompor ou não açúcares com a produção de ácidos orgânicos e CO<sub>2</sub>. A Candida albicans fermenta a glicose, galactose, maltose e não fermenta a sacarose, melibiose, rafinose, celobiose, lactose, melizitose e inulina; a trealose pode ou não ser fermentada.

### 5.3 Amostragem

Deve ser realizada conforme descrito no Guia de Orientação para Coleta e Preservação de Amostras (CETESB).

#### 5.3.1 Amostra

5.3.1.1 Identificação: a amostra deve ser bem identificada e todas as informações sobre a mesma devem ser completas (nº da amostra, data, local, pH, temperatura, cloro residual e outras informações necessárias para que os resultados possam ser interpretados corretamente).

5.3.1.2 Agente neutralizador de cloro residual: para a coleta de amostras de águas tratadas, deve-se adicionar ao frasco de coleta, antes de sua esterilização, 0,1 mL de uma solução a 1,8% de tiosulfato de sódio para cada 100 mL da amostra, para neutralizar a ação do cloro residual. Essa quantidade de tiosulfato de sódio é suficiente para neutralizar concentrações de até 5 mg/L de cloro residual, sendo adequada para as amostragens de rotina. Em situações especiais, como por exemplo em emergências, em que o residual de cloro pode ser maior, uma maior quantidade de tiosulfato é requerida. Nestes casos, podem ser utilizados volumes de 0,1 mL de uma solução a 10% de tiosulfato de sódio para cada 100 mL da amostra, sendo esta quantidade suficiente para neutralizar concentrações de até 15 mg/L de cloro residual.

5.3.1.3 Agentes quelantes: para a coleta de amostras de águas poluídas, suspeitas de conterem concentrações superiores a 0,1 mg/L de metais pesados, tais como cobre, zinco, etc., deve-se adicionar ao frasco de coleta, antes de sua esterilização, 0,3 mL de uma solução a 15% de EDTA, para cada 100 mL da amostra, além do tiosulfato de sódio (volumes de 0,1 mL de uma solução a 10% para cada 100 mL da amostra). A solução de EDTA pode ser adicionada ao frasco de coleta separadamente ou já combinada com a solução de tiosulfato de sódio antes da adição. O EDTA atua como agente quelante, reduzindo a ação

tóxica de metais, apresentando uma ação mais ampla que o tiosulfato de sódio, o qual, na concentração empregada, previne apenas a ação bactericida do cobre.

5.3.1.4 Transporte e conservação: após a coleta, a amostra deve ser enviada ao laboratório o mais rápido possível. O tempo máximo ideal entre a amostragem e início do exame é de 8 horas, sendo que o tempo limite não deve exceder 24 horas. As amostras devem ser transportadas sob refrigeração (4 a 10°C) e conservadas assim até o início do exame.

#### 5.4 Procedimento

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

5.4.2 Disponibilizar sobre a bancada de trabalho o material necessário à execução do ensaio, a saber:

5.4.2.1 Equipamento de filtração, com os porta-filtros previamente esterilizados.

5.4.2.2 Placas de Petri de 48 mm x 8,5 mm, contendo o meio MCA, identificadas com o número da amostra (que deverão conter), o volume a ser filtrado e a data.

5.4.2.3 Provetas graduadas estéreis, com a abertura recoberta com papel alumínio, identificadas com o número da amostra.

5.4.2.4 Água de diluição estéril, contida em balões identificados com o número do porta-filtro, para cujo enxágüe serão utilizados.

5.4.2.5 Pinça com as extremidades mergulhadas em álcool.

5.4.2.6 Membranas filtrantes estéreis, com 47 mm de diâmetro, porosidade de 1,2 µm, brancas, quadriculadas.

5.4.2.7 Bicos de Bunsen, para manterem o ambiente asséptico e efetuar a flambagem das pinças utilizadas.

#### 5.4.3 Preparação do porta-filtro

5.4.3.1 Retirar a parte superior do porta-filtro e, com uma pinça flambada e esfriada, colocar uma membrana filtrante estéril, com a

face quadriculada voltada para cima, centralizando-a sobre a parte inferior do porta-filtro.

5.4.3.2 Acoplar a parte superior do porta-filtro, tendo cuidado para não danificar a membrana.

5.4.4 Preparação da amostra para a filtração

5.4.4.1 Para volumes iguais ou superiores a 20 mL:

- a) homogeneizar a amostra, por agitação manual, inclinando o frasco (formando um ângulo de aproximadamente  $45^{\circ}$  entre o braço e o antebraço) e agitando vigorosamente; repetir a operação no mínimo 25 vezes;
- b) distribuir os volumes requeridos da amostra em provetas estéreis e proceder à filtração como em 5.4.5.

5.4.4.2 Para volumes inferiores a 20 mL:

- a) adicionar ao porta-filtro 20 a 30 mL de água de diluição estéril (não é necessário medir o volume, pois este servirá apenas de suporte para que as bactérias existentes na amostra se distribuam uniformemente na superfície da membrana, ao ser efetuada a filtração);
- b) homogeneizar a amostra (como em 5.4.4.1.a) e, com auxílio de uma pipeta estéril, retirar o volume desejado e proceder à filtração como em 5.4.5.

5.4.4.3 Para volumes decimais (diluição da amostra):

- a) efetuar as diluições decimais da amostra da seguinte forma:
  - proceder à 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 5.4.4.1.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  $90 \pm 2$  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  $90 \pm 2$  ml de água de diluição estéril. Prepara-se assim a 2ª 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 ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , .....  $10^{-8}$ .....).
- b) após o preparo das diluições, preparar o porta-filtro como descrito em 5.4.4.2.a e, após homogeneização da diluição selecionada para filtração (conforme 5.4.4.1.2), retirar o volume desejado com uma pipeta estéril e proceder à filtração como em 5.4.5.

#### 5.4.5 Filtração dos volumes da amostra

5.4.5.1 Verter cuidadosamente no porta-filtro o volume da amostra a ser examinado, evitando que a água respingue sobre as bordas superiores.

5.4.5.2 Ligar a bomba de vácuo e proceder à filtração.

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

5.4.5.4 Desligar a bomba de vácuo, ao finalizar a operação. Evitar secagem excessiva da membrana filtrante.

5.4.6 Colocar a placa de Petri correspondente, contendo o meio MCA em frente ao conjunto de filtração e, com o auxílio de uma pinça, entreabrí-la.

5.4.7 Separar a parte superior do porta-filtro e, com uma pinça cujas extremidades foram flambadas, retirar a membrana com cuidado para que a pinça toque apenas na parte periférica da mesma, fora da área de filtração. Acoplar novamente a parte superior do porta-filtro à parte inferior.

5.4.8 Obedecendo aos cuidados de assepsia, colocar cuidadosamente a membrana, com a superfície quadriculada voltada para cima, na super

fície do meio MCA, contido na placa de Petri (ver Figura 2).

5.4.9 Verificar se houve formação de bolhas de ar entre a membrana e o meio de cultura. Se isto ocorrer, levantar uma das bordas da membrana com uma pinça estéril e, fazendo movimentos circulares, deslocar a membrana com a finalidade de eliminá-las, pois as bolhas impedem o contato das bactérias com o meio de cultura, dificultando ou mesmo impedindo seu crescimento.

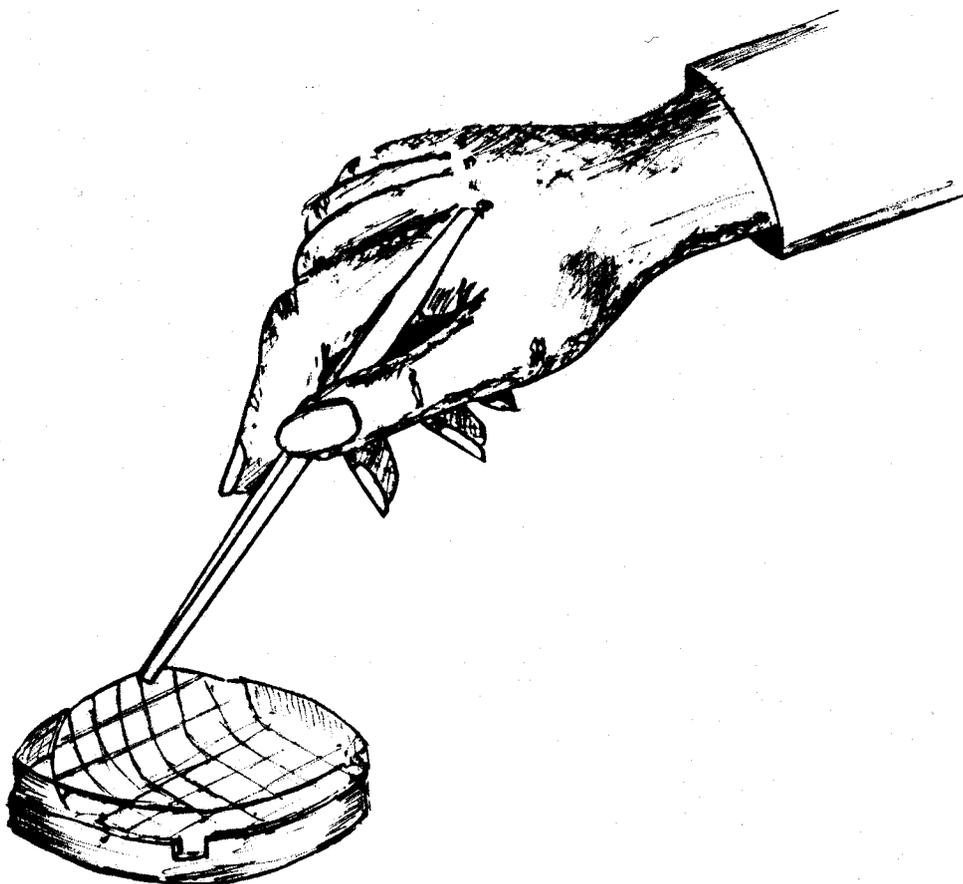


FIGURA 2 - Colocação da membrana filtrante na superfície do meio de cultura

5.4.10 Lavar novamente o porta-filtro com água de diluição estéril e proceder à próxima filtração.

5.4.11 Os porta-filtros devem estar estéreis no início de cada série de filtrações e essa série não deve envolver mais de 30 amostras. Se houver um intervalo de 30 minutos entre uma filtração e outra, os porta-filtros devem ser esterilizados novamente, para evitar uma contaminação acidental. A rápida esterilização dos porta-filtros po

de ser efetuada pelos seguintes processos:

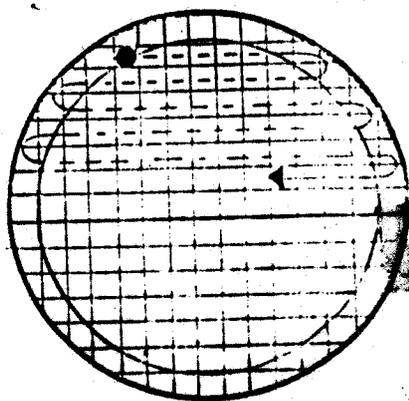
- a) exposição à radiação ultra-violeta durante dois minutos;
- b) imersão em água fervente, durante 30 minutos, no mínimo.

5.4.12 Visando o controle de esterilidade de cada porta-filtro usado para uma série de filtrações, é necessário efetuar a filtração de uma amostra de 100 mL de água de diluição estéril, antes de ser iniciada a filtração das amostras em teste, devendo também ser intercalada a filtração de uma amostra de água de diluição estéril entre cada série de 10 amostras filtradas no mesmo porta-filtro.

5.4.13 Após a filtração das amostras e posterior transferência das membranas filtrantes para as placas de Petri, colocar essas placas em posição invertida em bandejas forradas com toalha molhada, ou de outro material que conserve a umidade requerida, e num período não superior a 30 minutos após a filtração efetuar sua incubação a  $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  durante 72 horas.

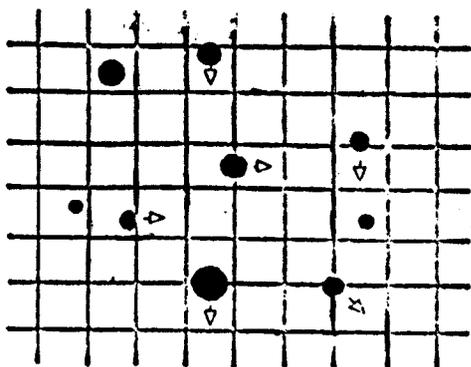
5.4.14 Após o período de incubação, retirar as placas da incubadora e efetuar a contagem, selecionando para leitura, entre os volumes filtrados de cada amostra, aquele que tiver fornecido contagem entre 20 a 60 colônias típicas de Candida albicans. No meio MCA, as colônias típicas de Candida albicans apresentam-se com coloração marrom, são colônias arredondadas, lisas e brilhantes com diâmetro de aproximadamente 1 mm.

5.4.15 Com auxílio de um microscópio estereoscópico com ampliação de 10 a 15 diâmetros efetuar a contagem das colônias típicas nas placas selecionadas para leitura. Para essa contagem, observar as Figuras 3 e 4. É recomendável o uso de uma lâmpada fluorescente branca.



Nota: O círculo interno indica a área de filtração e as linhas pontilhadas indicam a seqüência de contagem

FIGURA 3 - Modelo para contagem das colônias



Nota: As colônias são contadas nos quadrados indicados pelas setas

FIGURA 4 - Porção da membrana filtrante quadriculada, em aumento

5.4.16 Após a contagem e registro do número de colônias típicas de Candida albicans, selecionar um número adequado das mesmas para serem submetidas à confirmação, procedendo da seguinte forma:

5.4.16.1 Se o número de colônias típicas de Candida albicans for igual ou inferior a 10, submeter todas à confirmação.

5.4.16.2 Se o número de colônias típicas de Candida albicans for superior a 10, selecionar 10 colônias para serem submetidas à confirmação.

5.4.17 A confirmação para Candida albicans deve se proceder do seguinte modo:

- a) a partir do número de colônias típicas de Candida albicans determinado para verificação, identificar tubos de Sabouraud dextrose agar com ciclohexamida e cloranfenicol inclinado, de tal modo que a cada colônia corresponda um tubo;
- b) flambar e resfriar uma alça de inoculação (fio de platina ou níquel-cromo, com a parte final encurvada, formando um aro de diâmetro mínimo de 3 mm);
- c) com a alça, colher um inóculo da colônia a ser submetida à confirmação e repicar através de estrias, cada colônia típica selecionada para o tubo correspondente de Sabouraud dextrose agar com ciclohexamida e cloranfenicol, previamente identificado;
- d) incubar durante 24 a 48 horas à temperatura de  $25-35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . As colônias em Sabouraud dextrose agar são de coloração branca ou creme claro, superfície lisa e bri

lhante, bordas íntegras e consistência cremosa; nas culturas envelhecidas aparecem pregas dobradas formando sulcos e rugas na superfície e algumas vezes com projeções peludas;

- e) quando o crescimento for detectado, continuar a confirmação.

#### 5.4.17.1 Pesquisa de tubo germinativo

A partir do crescimento em Sabouraud dextrose agar com ciclohexamida e cloranfenicol, transferir, com uma alça de inoculação, uma pequena quantidade de cultura para um tubo de ensaio 12 mm x 120 mm contendo 0,5 ml de soro fetal bovino. Incubar a  $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por um período de 2 até 3 horas. Após o período de incubação retirar os tubos da estufa e com uma alça de inoculação, transferir uma pequena quantidade de cultura para uma lâmina de vidro e, sobre a mesma, adicionar a lamínula. Repetir quantas vezes for necessária a leitura dentro do período de incubação de 2 a 3 horas para a visualização da formação do tubo germinativo. A leitura deve ser feita ao microscópio usando-se as objetivas de 10 X e 40 X.

A presença de tubo germinativo indica a presença de Candida albicans. O tubo germinativo é um tubo verdadeiro, formado a partir dos blastosporos; essa formação é de base estreita e sem constricção entre o tubo germinativo e o blastosporo de origem. (vide Figura 5).

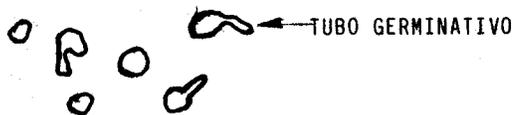


FIGURA 5 - Ilustração de tubo germinativo

#### 5.4.17.2 Microcultivo em lâmina

Paralelamente a prova de tubo germinativo colher um inóculo do mesmo crescimento do tubo de Sabouraud dextrose agar com ciclohexamida e cloranfenicol e fazer um microcultivo em lâmina. Para o procedimento desta técnica segue-se desta forma:

- a) colocar para esterilizar em estufa regulada a  $25-35^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos uma placa de Petri contendo no seu interior: um tubo de vidro recurvado (em forma de "U"), papel de filtro, lâmina e lamínula;
- b) fundir o meio de agar fubá-Tween 80, e com uma pipeta Pasteur, previamente esterilizada, verter uma pequena quantidade sobre a lâmina de microscópio, no interior

- da placa de Petri, de modo a formar uma fina camada no centro da lâmina; deve-se ter o cuidado de evitar a formação de bolha de ar. Deixar solidificar;
- c) a partir do número de colônias típicas de Candida albicans determinado para a verificação, identificar placas para o microcultivo, de tal modo que a cada colônia corresponda uma placa;
  - d) flambar e resfriar uma alça de inoculação (fio de platina ou níquel-cromo, com a parte final encurvada, em forma de "L");
  - e) com a alça, colher um inóculo da colônia a ser submetida à confirmação e semear duas estrias finas na superfície do meio sobre a lâmina;
  - f) umedecer o papel de filtro com água destilada estéril;
  - g) fechar e incubar a placa a 21-25°C durante um período máximo de 5 dias;
  - h) examinar a lâmina ao microscópio após 24 horas de incubação, fazendo leituras diárias até completar o período de 5 dias, considerando típicas as colônias que apresentarem estruturas específicas de Candida albicans, tais como, clamidósporo, pseudomicélio e blastósporo (vide Figura 6).



FIGURA 6 - Ilustração de estruturas específicas

5.4.17.3 Para cada cultura em Sabouraud dextrose agar com ciclohexamida e cloranfenicol que tenham apresentado no microcultivo estruturas específicas para a confirmação de Candida albicans, fazer prova para assimilação do carbono e nitrogênio (auxonograma) e prova de fermentação de açúcares (zimograma).

#### 5.4.17.3.1 Auxonograma

A prova de auxonograma é realizada através da pesquisa de fonte de carboidratos e fonte de nitrogênio, conforme a seguir:

##### Fonte de carboidratos

- a) flambar e resfriar uma alça de inoculação (fio de platina ou níquel-cromo), com a parte final encurvada, formando um aro de diâmetro mínimo de 3 mm);
- b) com a alça colher um inóculo do crescimento em Sabouraud dextrose agar com ciclohexamida e cloranfenicol;

- c) depositar o inóculo em um tubo de ensaio de 12 mm x 120 mm contendo aproximadamente 2 mL de água destilada estéril fazendo desta forma uma suspensão até que a turvação seja igual a 3 da escala de McFarland (comparar a um controle as sim preparado: 3 mL de  $\text{BaCl}_2$  a 1% mais 97 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 1% - 0,36N);
- d) em paralelo, fundir o meio Wickerham para N e estabilizá-lo à temperatura de 45 a 50°C;
- e) verter em uma placa de Petri estéril, a suspen são previamente preparada e o meio de Wickerham para N estabilizado, homogeneizar e deixar soli dificar;
- f) secar a placa em estufa regulada a uma tempera tura de  $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$  por 30 minutos para a total eva poração da água de condensação, evitando dessa forma alteração na difusibilidade dos carboidra tos do meio;
- g) com uma pinça devidamente flambada e esfriada colocar os discos de carboidratos (glicose, ga lactose, maltose, sacarose, etc) na placa con tendo a suspensão e o meio Wickerham para N. (Os discos de carboidratos podem ser substitui dos por aproximadamente 0,05 g do carboidrato);
- h) após a colocação dos discos na placa, pressioná- los levemente, com uma pinça estéril, para que entrem em firme contato com a superfície do meio de cultura. Devem ser colocados 4 discos por placa equidistantes, para impedir a sobre posição das zonas de assimilação que podem alte rar e dificultar a leitura e interpretação dos resultados;
- i) marcar com lápis dermatográfico o fundo da pla ca no local em que cada disco foi colocado;
- j) incubar a placa em posição invertida à 21-25°C durante 24-48 horas;
- l) após o período determinado de incubação, efetuar a leitura; o resultado positivo será observado através da formação de um halo opaco de assimi lação ao redor do disco do carboidrato.

### Fonte de nitrogênio

Proceder como para fonte de carboidratos, trabalhando agora com o meio Wickerham para C e discos de nitrogênio ( $\text{KNO}_3$  e peptona).

#### 5.4.17.3.2 Zimograma

Para a prova de fermentação de açúcares (zimograma) segue-se do seguinte modo:

- a) com uma alça de inoculação (fio de platina ou níquel-cromo, com a parte final encurvada, formando um arco de diâmetro mínimo de 3 mm) devidamente flambada e esfriada, transferir o inóculo do crescimento de 24 a 48 h em Sabouraud dextrose agar com ciclohexamida e cloranfenicol para cada um dos tubos previamente identificados, contendo o meio de fermentação com seu respectivo açúcar (glicose, galactose, maltose, sacarose, etc);
- b) entre a repicagem de um tubo contendo um determinado açúcar para o outro, lavar a alça de inoculação em água destilada estéril antes de ser flambada;
- c) incubar os tubos à uma temperatura de 25 a 30°C, observando-se diariamente, até completar um período de 14 a 21 dias;
- d) efetuar a leitura considerando:
  - presença de gás no tubo de Durham: prova positiva;
  - ausência de gás no tubo de Durham: prova negativa.

5.4.18 A partir do número de colônias confirmadas como Candida albicans calcular a densidade dessas leveduras conforme 6.2.

## 6 RESULTADOS

6.1 A densidade de Candida albicans determinada através da técnica de membrana filtrante é expressa como: número de colônias de Candida albicans por 500 mL. O número de Candida albicans é obtido a partir do número de colônias que, submetidas ao teste de confirmação, apresentaram resultado positivo em pesquisa de tubo germinativo e microcultivo em lâmina.

6.2 A determinação da densidade de Candida albicans a partir do número de colônias típicas com resultado confirmativo positivo em pesquisa de tubo germinativo e microcultivo em lâmina, é feita através

da aplicação da seguinte fórmula geral:

$$\text{NC.MF de } \underline{\text{Candida albicans}}/500 \text{ mL} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de colônias típicas com resultado confirmativo positivo} \times 500}{\text{volume filtrado da amostra (mL)}}$$

6.3 Para a aplicação desta fórmula, devem ser consideradas as duas situações descritas em 6.3.1 e 6.3.2.

6.3.1 Na situação em que a contagem de colônias típicas de Candida albicans na membrana filtrante é igual ou inferior a 10, todas são submetidas à confirmação e o número de colônias com resultado confirmativo positivo é usado diretamente para o cálculo da densidade.

Exemplo:

- a) total de colônias no meio MCA = 10
- b) total de colônias submetidas à confirmação = 10
- c) total de colônias com resultado confirmado positivo = 6
- d) expressão do resultado final:

$$\text{NC.MF. de } \underline{\text{Candida albicans}}/500 \text{ mL} = \frac{6}{\text{volume filtrado da amostra}} \times 500$$

6.3.2 Na situação em que a contagem de colônias típicas de Candida albicans na membrana filtrante é superior a 10, somente 10 colônias são submetidas à confirmação, havendo, portanto, a necessidade de se calcular a porcentagem de confirmação e extrapolar os dados para o número total de colônias.

Exemplo:

- a) número total de colônias típicas no meio MCA = 30
- b) número de colônias submetidas a confirmação = 10
- c) número de colônias com resultado positivo = 6
- d) porcentagem de colônias com resultado confirmativo positivo em relação às submetidas à confirmação = 60%
- e) se o número total de colônias é 30 e a porcentagem de confirmação é 60%, o número de colônias com resultado confirmativo positivo no teste de verificação será:

$$\frac{30 \times 60}{100} = 18 \text{ colônias}$$

- f) expressão dos resultados:

$$\text{NC.MF de } \underline{\text{Candida albicans}}/500 \text{ mL} = \frac{18}{\text{volume filtrado da amostra}} \times 500$$

6.4 Para a determinação de Candida albicans em uma amostra, deve-se filtrar 500 mL em uma única membrana, mas em casos que a amostra apresentar uma densidade elevada de algas, a mesma deve ser subdividida em volumes mais adequados para a filtração.

6.5 Para a realização desses cálculos irá se requerer a consideração prévia dos seguintes itens quanto à seleção das placas para ser efetuada a contagem de colônias típicas.

6.5.1 Leitura das placas como contagens dentro dos limites aceitáveis (20 a 60 colônias típicas).

6.5.1.1 Quando apenas um volume filtrado fornece contagem aceitável. Considera-se o seguinte exemplo: a filtração de volumes de 50, 25, 10, 1 e 0,5 mL de uma amostra fornece, respectivamente, as seguintes contagens: 200, 110, 40, 8 e 3. O analista não deve contar as colônias em todos os filtros; por inspeção, deve selecionar a membrana com 20-60 colônias e efetuar a contagem apenas nessa placa; no exemplo acima, a contagem de colônias será efetuada apenas na membrana correspondente à filtração de 10 mL (40 colônias). Para o cálculo da densidade de Candida albicans em 500 mL, aplicar a fórmula apresentada no item 6.2 e, no caso em que a porcentagem de confirmação dessas colônias típicas tiver sido 100%, essa densidade será:

$$\text{n}^\circ \text{ de colônias/500 mL} = \frac{40}{10} \times 500$$

O resultado final será expresso como:

$$\text{NC.MF de } \underline{\text{Candida albicans}}/\text{500 mL} = 2000$$

Se a porcentagem de confirmação das colônias típicas for inferior a 100%, considerar, para esse cálculo, o exposto em 6.3.1 e 6.3.2.

6.5.1.2 Quando mais um volume filtrado fornece contagens aceitáveis. Neste caso, é efetuada a leitura em todas as placas em que a contagem estiver dentro dos limites aceitáveis (20-60 colônias). Cada uma das contagens obtidas é utilizada, separadamente, para o cálculo do número de colônias em 500 mL, segundo a fórmula apresentada no item 6.2., e o resultado final em 500 mL será obtido a partir do cálculo da média aritmética entre esses valores.

Exemplificando:

Volumes de 0,1 mL, 0,05 mL e 0,01 mL de uma amostra forneceram contagens de 60, 28 e 7 colônias, respectivamente. Neste caso, dois volumes (0,1 e 0,05) forneceram contagens dentro dos limites aceitáveis. Considerando que a porcentagem de confirmação das colônias típicas tenha sido 100%, calcular o resultado para 500 mL independentemente para cada uma dessas contagens:

$$\frac{60}{0,1} \times 500 = 300.000/500 \text{ mL}$$

$$\frac{28}{0,05} \times 500 = 280.000/500 \text{ mL}$$

A seguir, calcular a média aritmética entre esses 2 valores:

$$\frac{300.000 + 280.000}{2} = 290.000$$

o resultado final será expresso como:

$$\text{NC.MF de } \underline{\text{Candida albicans}}/500 \text{ mL} = 290.000$$

Se a porcentagem de confirmação das colônias típicas tiver sido inferior a 100%, considerar, para essa seqüência de cálculos, o exposto nos itens 6.3.1 e 6.3.2.

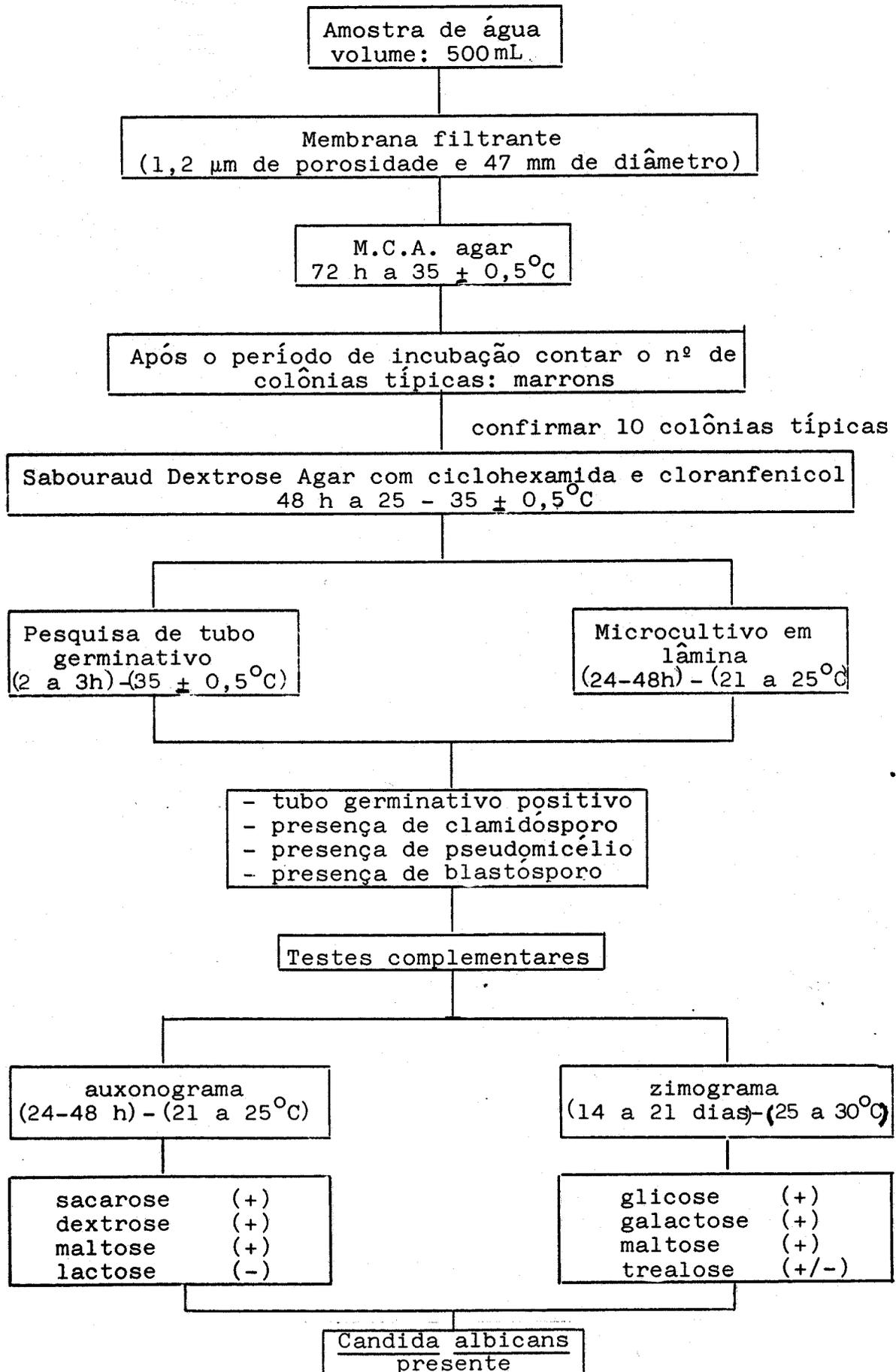
#### 6.5.2 Leitura das placas com contagem fora dos limites aceitáveis.

6.5.2.1 Quando todos os volumes filtrados fornecem contagens inferiores a 20 colônias típicas de Candida albicans.

Neste caso, efetuar a contagem em todas as placas correspondentes aos volumes filtrados. O resultado final será calculado a partir da aplicação da seguinte fórmula:

$$\text{NC.MF de } \underline{\text{Candida albicans}}/500 \text{ mL} = \frac{\text{soma das contagens de colônias típicas com resultado confirmativo positivo}}{\text{soma dos volumes correspondentes as contagens}} \times 500$$

## ANEXO A - DEMONSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA SEQUÊNCIA DO PROCEDIMENTO



### A-1 Caracterização bioquímica de Candida albicans

A identificação rápida da Candida albicans é de fundamental importância nos processos patológicos. Baseia-se nos seguintes princípios:

- formação de clamidósporo;
- formação de tubo germinativo;
- reações cromogênicas;
- complexo antígeno - anticorpo.

Necessário também se fazer, testes bioquímicos adicionais, particularmente os de natureza taxomônica comparativa.

#### A-1.1 Prova de fermentação dos carboidratos

Candida albicans utiliza os seguintes carboidratos: glicose, maltose, galactose e a trealose. Candida albicans não fermenta: sacarose, melibiose, rafinose, celobiose, lactose, melizitose e inulina.

#### A-1.2 Prova de assimilação dos carboidratos

Candida albicans assimila os seguintes carboidratos: glicose, galaçtose, sacarose, maltose, trealose, amido solúvel, D-xilose. Também há os carboidratos que podem ou não ser assimilados: L-Sorbose, melizitose, etanol, glicerol, irbitol, D-glucitol,  $\alpha$ -metil-d-glicoside, DL-ácido láctico, ácido succínico, ácido cítrico, L-arabinose.

Candida albicans não assimila: lactose, melibiose, rafinose, inuliina, D-ribose, L-raminose, eritritol, galactitol, D-arabinose, inositol e nitrato de potássio.

## ANEXO B - RECOMENDAÇÕES DE ORDEM GERAL

### B-1 Cuidados especiais no preparo do meio MCA

Recomenda-se que, no preparo do meio MCA, seja efetuado um ajuste do pH para 7,1 antes da esterilização e após a esterilização o pH do meio deve ficar entre 6,6 - 6,8, para que as colônias típicas possam ser coradas pelo sal de bismuto, que é o sistema indicador.

### B-2 Cuidados especiais com a vidraria

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

### B-3 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-4 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 determinação de Candida albicans pela técnica de membrana filtrante. Ver Norma CETESB L5.216.

### B-5 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-5.1 Poros

Os poros da membrana filtrante devem ser uniformes em diâmetro e apresentar-se uniformemente distribuídos. Poros com diâmetros irregulares 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-5.2 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 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, propiciando 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 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 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, freqüentemente ocorre curvatura das bordas da membrana, impedindo o contato com o substrato.

#### B-6 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 disso, 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 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 no laboratório.

#### B-7 Controle da eficiência da autoclave

Utilizar ampolas com suspensão de esporos 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 autoclavação, são incubadas em banho-maria a 55°C, durante 24 a 48 h. 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-8 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, de

ANEXO C - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARESC-1 Lâmpadas germicidas ultra-violeta (U.V.)C-1.1 Características gerais

São lâmpadas que emitem radiações ultra-violeta com ação germicida. A luz ultra-violeta inclui radiações entre 150 e 4000 Angstroms ( $\text{\AA}$ ), mas radiações inferiores a 1800  $\text{\AA}$  são absorvidas pelo oxigênio atmosférico, não tendo, portanto, aplicação para esterilização. O efeito mais potente para a morte de microrganismos ocorre a 2600  $\text{\AA}$ . As lâmpadas germicidas comerciais emitem primariamente 2537  $\text{\AA}$ , que tem 85% da capacidade germicida das radiações de 2600  $\text{\AA}$ .

C-1.2 Avaliação da eficiência na esterilização

Embora a vida média de uma lâmpada U.V. possa ser de 5000 horas, na prática esse tempo depende primariamente das características individuais das lâmpadas e do número de vezes em que a mesma é utilizada. Assim, a simples manutenção do log do número de horas de operação e sua comparação com o tempo-limite recomendado pelo fabricante é de valor questionável como único controle na avaliação da eficiência das lâmpadas germicidas no processo de esterilização. Para um controle efetivo, as lâmpadas devem ser testadas quinzenalmente, com um medidor de luz U.V. (luxímetro) e substituídas se estiverem emitindo menos de 80% de sua capacidade inicial. É recomendada também, para essa avaliação, a realização de teste bacteriológico específico, sendo a seguinte a sequência de procedimento para sua execução:

- a) preparar "Plate Count Agar" em quantidade adequada para o número de placas necessárias para o teste e distribuir volumes de 10 a 15 mL do meio fundido em placas de Petri de 15 mm x 150 mm. Manter essas placas ligeiramente abertas em ambiente asséptico, até que o meio se solidifique e a água de condensação evapore. Fechar as placas e mantê-las em refrigerador até o momento do uso.

Nota: Ver Norma CETESB L5.201, para informações quanto à composição e preparo de "Plate Count Agar".

- b) preparar uma série de diluições de uma cultura de uma bactéria do grupo coliforme, de modo a obter uma diluição tal que um inóculo de 0,5 mL da mesma forneça contagem de 200 a 250 microrganismos.

Nota: Ver Norma CETESB L5.215 para informações quanto ao preparo da suspensão bacteriana e diluições da mesma.

- c) para a realização do teste, pipetar 0,5 mL da diluição selecionada (contagens de 200 a 250 microrganismos) na superfície do "Plate Count Agar", contido em placas preparadas segundo especificado no item a.
- d) a seguir, com todos os cuidados de assepsia, efetuar o espalhamento do inóculo sobre a superfície do "Plate Count Agar". Para isso, proceder da seguinte maneira:
- colocar uma alça de Drigalski em um recipiente com álcool etílico. Removê-la e passar por uma chama.
  - Após todo o álcool ter sido queimado, deixar esfriar durante 15 segundos e, antes de efetuar o espalhamento, testar se a temperatura da alça é segura para uso, tocando com a mesma o "Plate Count Agar", nas bordas da placa de Petri em que o mesmo está contido.
  - Após essa verificação, efetuar o espalhamento, posicionando a alça de Drigalski perpendicularmente à superfície do agar, no ponto em que o inóculo foi depositado. Mantendo a placa parada, efetuar movimentos circulares com a alça, até o completo espalhamento do inóculo sobre toda a superfície do meio de cultura.
  - Após ter sido usada, colocar a alça de Drigalski em solução desinfetante.
- e) após o espalhamento, colocar cada placa sob a luz ultra-violeta, nos pontos em que se deseja verificar sua eficiência na esterilização, mantendo-as abertas durante dois minutos. Como controle, separar uma das placas inoculadas, mantendo-a aberta sob a luz comum do laboratório, pelo mesmo período de tempo.
- f) fechar as placas e incubá-las a 35°C durante 24 horas. Após esse período de incubação, efetuar a contagem em todas as placas. A placa-controle deve conter 200-250 colônias e, nas placas irradiadas por luz ultra-violeta, é esperada uma redução mínima de 99% em relação à contagem obtida na placa-controle. Se essa redução for inferior a 80%, a lâmpada ultra-violeta em teste deve ser substituída.

## C-2 Placas de Petri de plástico - procedimento para reutilização

Embora consideradas como item descartável, as placas de Petri de plástico podem ser reutilizadas, desde que submetidas a processos de lavagem e esterilização adequados.

Para essa finalidade, é a seguinte a seqüência de procedimentos recomendados:

### C-2.1 Descontaminação

Em relação às placas de Petri, em que ocorreu crescimento de microrganismos na superfície da membrana em seu interior, antes da lavagem é requerida uma descontaminação prévia. Para isso, proceder da seguinte maneira:

- a) com uma pinça, retirar a membrana e o meio de cultura contido na placa e acondicionar adequadamente esse material para posterior descontaminação em autoclave a 121°C durante 30 minutos.

Nota: para a retirada desse material é recomendado o uso de luvas para evitar a contaminação do técnico.

- b) após a retirada da membrana e do meio de cultura, separar a tampa e o fundo das placas de Petri e imergí-los separadamente em solução de formol a 40%, durante 15 minutos.
- c) retirar as placas de solução de formol a 40% e colocar separadamente tampas e fundos das placas em solução de álcool a 70% durante duas horas.

Em relação às placas de Petri, em que não ocorreu crescimento de microrganismos na superfície da membrana em seu interior, proceder conforme itens a e c, não sendo necessária a colocação em solução de formol a 40%. Quanto ao meio de cultura e membranas retirados dessas placas, os mesmos devem ser embalados adequadamente para descarte, não sendo requerida sua autoclavação, visto não ter ocorrido crescimento de microrganismos.

### C-2.2 Lavagem

- a) se necessário, colocar separadamente tampas e fundos em uma solução fraca de detergente, deixando por um período de tempo requerido para facilitar a remoção de resíduos de meio de cultura;
- b) lavar cuidadosamente, cada parte da placa, com auxílio de

uma esponja, para eliminar qualquer resíduo de meio de cultura;

- c) enxaguar em água corrente, efetuando um mínimo de 10 enxagues, sempre esfregando com a mão as superfícies interna e externa das placas;
- d) enxaguar uma vez em água destilada ou desionizada.

### C-2.3 Esterilização

- a) imergir as tampas e fundos das placas de Petri, separadamente, em álcool etílico a 70% durante 1 hora;
- b) retirar as placas de Petri da solução e deixar secar à temperatura ambiente em um local asséptico;
- c) após a completa secagem, expor as partes internas da tampa e fundo das placas de Petri à ação direta de radiação ultra-violeta durante 2 h.

### C-2.4 Preparo final

Após a esterilização, juntar a tampa e fundo rapidamente, sem tocar na superfície interna das placas. Embrulhar em papel kraft ou acondicionar em caixas adequadas com tampa, guardando em armários que tenham boa vedação contra poeira.

## C-3 Vantagens e limitações da técnica de membrana filtrante

### C-3.1 Vantagens

- a) a técnica de membrana filtrante tem maior grau de precisão que a técnica de tubos múltiplos, proporcionando maior grau de reprodutibilidade de resultados;
- b) através da técnica de membrana filtrante pode-se examinar volumes bem maiores da amostra em relação aos examinados pela técnica de tubos múltiplos;
- c) o tempo para obtenção de resultados é bem inferior em relação ao requerido pela técnica de tubos múltiplos.

Além disto, a utilização desta técnica determina:

- a) redução no tempo requerido para a preparação dos meios de cultura e da vidraria;
- b) economia de espaço na incubadora;
- c) redução no tempo requerido para as operações de inoculação,

leitura e repicagem de culturas.

Disto resulta o aumento da capacidade do laboratório em termos de número de amostras por dia, sem que haja aumento da quantidade de horas-homem dispendidas e da quantidade necessária de meios de cultura.

Esta técnica permite ainda a filtração de amostras no campo ou em localidades distantes do laboratório.

### C-3.2 Limitações

A técnica de membrana filtrante apresenta algumas limitações (em geral não associadas à aplicação no controle de águas potáveis), que impedem sua utilização em várias situações, como substituta da técnica de tubos múltiplos.

Os principais fatores responsáveis por essas limitações são os indicados de C-3.2.1 a C-3.2.4.

#### C-3.2.1 Materiais em suspensão

A presença de materiais em suspensão pode limitar a aplicação da técnica de membrana filtrante para qualquer amostra, pois o crescimento poderá se apresentar como uma película contínua sobre a superfície, impossibilitando a contagem. Esta limitação depende do volume a ser filtrado, da espessura da camada de material retido sobre a membrana e também do tipo de material em suspensão. Assim, camadas relativamente delgadas de materiais higroscópicos como ferro, manganês, alumínio ou algas, podem obstruir os poros da membrana, ao passo que camadas mais espessas de materiais cristalinos ou silicosos podem causar pouca ou nenhuma dificuldade.

Quando uma amostra de água apresenta alta turbidez, mas se sabe que a população de Candida albicans é alta, esse problema pode ser eliminado através da filtração de volumes pequenos da amostra.

#### C-3.2.2 Presença de metais pesados

Certas águas altamente poluídas com resíduos industriais podem conter mais que 1 mg/L de zinco ou cobre; estes íons, que exercem uma ação microbicida podem ser adsorvidos à membrana e, assim, impedir o crescimento de microrganismos, fazendo com que sejam obtidos resultados irregulares para Candida albicans.

Para amostras deste tipo, recomenda-se a adição de um agente quelante (EDTA) ao frasco, antes de se efetuar a coleta da amostra.

### C-3.2.3 Presença de fenóis ou metais tóxicos

Esgotos submetidos a tratamento primário, seguido de cloração ou esgotos contendo fenóis ou metais tóxicos, provenientes de resíduos industriais, não podem ser analisados pela técnica de membrana filtrante.

### C-3.2.4 Presença de algas

A presença de algas nas amostras impossibilita a utilização da técnica de membrana filtrante, pois ocorre obstrução dos poros da membrana, formando-se uma película em sua superfície, podendo impedir o crescimento ou a visualização das colônias.

### C-3.3 Fatores que intervêm na escolha da técnica da membrana filtrante

A decisão da escolha da técnica de membrana filtrante para determinar a qualidade da água, do ponto de vista bacteriológico, pode ser baseada em:

- a) aplicabilidade do exame às águas a serem examinadas;
- b) disponibilidade de equipamentos e materiais de boa qualidade;
- c) habilidade técnica do pessoal do laboratório;
- d) conveniência;
- e) fatores econômicos;
- f) atitudes administrativas.

ANEXO D - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- D-1 AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Microbiological Examination of Water. In: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 16 ed. Washington, APWA, AWWA, WPCF, 1985. p. 827-1038.
- D-2 BUCK, J. D. & BUBUCIS, P. M. Membrane Filter Procedure for Enumeration of Candida albicans in Natural Waters. Applied and Environmental Microbiology. 35 (2): 237-242, 1978.
- D-3 BUCK, J. D. Candida albicans - Bacterial Indicators. Health Hazards Associated With Water, ASTM STP 635. A.W. Hoadley and B. J. Dutka, 1977, p. 139-147.
- D-4 CETESB. Guia de orientação para coleta e preservação de amostras. São Paulo, 1982. 201 p.
- D-5 \_\_\_\_\_. Avaliação de laboratórios de análises bacteriológicas de água. São Paulo, 1978. (Norma Técnica L5.010).
- D-6 \_\_\_\_\_. Controle de qualidade de meios de cultura. São Paulo, 1979. (Norma Técnica L5.216).
- D-7 \_\_\_\_\_. Lavagem, preparo e esterelização de materiais em laboratório de microbiologia. São Paulo, 1978. (Norma Técnica M1.001).
- D-8 \_\_\_\_\_. Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos. São Paulo, 1978. (Norma Técnica L5.215).
- D-9 \_\_\_\_\_. Isolamento e contagem de fungos em águas, esgotos e resíduos sólidos. São Paulo, 1977. (Norma Técnica L5.204).
- D-10 COOKE, W. B. A Laboratory guide to fungi in polluted waters, sewage and sewage treatment systems. Their identification and culture. Environmental Health Series, Division of Water Supply and Pollution Control. Cincinnati, Ohio, 1963. p. 1-70.

- D-11 COOK, W. L. & SCHLITZER. Isolation of Candida albicans from freshwater and sewage. Applied and Environmental Microbiology, 41 (3): 840-842, 1981.
- D-12 COSTA, R. O. Introdução a Micologia - Micologia Médica. Jornal Brasileiro de Medicina. 12-13, 1985.
- D-13 DAVIS D. B.; DULBECCO, R.; EISEN. H.N.; GINSBERG S.H. Microbiology. 3 ed., 1980. p.817-850
- D-14 DUTKA, B. J. & SHERRY, J. Pathogens as indicators of water quality - 1. Candida albicans 2. Pseudomonas aeruginosa. Presented in: International Seminar Microbiological Indicators of Pollution and Health Hazards - São Paulo, Brazil, 1978.
- D-15 DUTKA, B. J. Methods for microbiological analysis of waters, wastewaters and sediments. Canada, Centre for Inland Waters, Burlington, Ontario, 1976.
- D-16 LENNETTE, E. H. SPAULDING, E. H. & TRUAUT, J.P. Manual of Clinical Microbiology. 2 ed. Washington, 1974. p. 463 - 569.
- D-17 LODDER, J. The Yeasts - A Taxonomic Study. 2 ed. Amsterdam, 1970.
- D-18 MC. GINNIS, MICHAEL R. Laboratory handbook of medical mycology, North Carolina, 1980.
- D-19 MINAMI, P. S. Técnicas Micológicas - Roteiro de aulas práticas, 1981, p. 31-39.
- D-20 PELCZAR, M., REID, R. & CHAN, E.C.S. Microbiologia, 1980, p. 315-363.
- D-21 PORTO, E. & LACAZ, C.S. Guia de micologia médica. Apresentado no: Curso Internacional de Micologia - junho 1984.

- 
- D-22 SILVEIRA, V. D. Micologia, 4 ed., Rio de Janeiro, 1981.
- D-23 SHERRY, J.P.; KUCHMA, S.R.; ZARZOUR, U. & DUTKA, B.J.  
Occurrence and significance of *Candida albicans* in lake Ontario bathing beaches. Burlington, Ontário, Canadá, 1979
- D-24 TIerno, P.M.; PHD, & MAYER MILSTOC, M.D. Germ tube positive *Candida tropicalis*, New York, 1976.
- D-25 ZAPATER, R.C. Atlas de diagnóstico micológico. Aplicación del Laboratorio. 3 ed. 1973.
-