



NORMA TÉCNICA

L5.206

Dez/1993
37 PÁGINAS

Staphylococcus aureus - determinação pela técnica de 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)

CETESB	STAPHYLOCOCCUS AUREUS - DETERMINAÇÃO PELA TÉCNICA DE MEMBRANA FILTRANTE	L5.206 DEZ/93
Método de ensaio		

SUMÁRIO

Introdução
1 Objetivo
2 Normas complementares
3 Definições
4 Aparelhagem
5 Execução do ensaio
6 Resultados
Anexo A - Esquema de procedimento
Anexo B - Recomendações de ordem geral
Anexo C - Informações complementares
Anexo D - Referências bibliográficas

INTRODUÇÃO

O gênero *Staphylococcus* compreende várias espécies, sendo *Staphylococcus aureus* o agente mais comum de infecções piogênicas. Estas infecções podem localizar-se na pele ou em regiões mais profundas e ocorrem quando essa bactéria penetra nos tecidos através de cortes ou de erupções da pele, sendo que a natureza da infecção depende da virulência desse microrganismo e do grau de defesa do indivíduo. Os estafilococos adquirem facilmente resistência aos antibióticos e quimioterápicos, dando lugar ao aparecimento de cepas resistentes responsáveis pela eclosão epidêmica de infecções supurativas, particularmente em ambiente hospitalar onde a utilização desses medicamentos é efetuada de maneira sistemática.

O principal reservatório de *S. aureus* na natureza é o homem, podendo ser isolado em várias partes do corpo, como nas fossas nasais, na garganta, no intestino e na pele. Embora não seja autóctone do ambiente aquático, essa bactéria pode estar presente em águas doces e marinhas, sendo pouco provável que se multiplique nessas águas, pois requer uma gama considerável de nutrientes orgânicos e condições adequadas de temperatura. Contudo, *S. aureus* está bem adaptado para sobreviver fora do hospedeiro humano, sendo muito resistente à luz solar, à desidratação e à salinidade.

Um enfoque especial tem sido dado nos últimos anos à pesquisa de *Staphylococcus aureus* em águas de piscina e em águas recreacionais devido ao fato de esse microrganismo estar relacionado com a alta incidência de infecções do trato respiratório superior (faringites, amigdalites, otites, infecções oculares) que ocorrem em banhistas que fazem uso dessas águas contaminadas, bem como em decorrência da elevada resistência que apresenta a desinfetantes halogenados, normalmente aplicados no processo de desinfecção de piscinas. *S. aureus* pode vir a se constituir no principal contaminante bacteriano de águas recreacionais com elevada densidade de banhistas, podendo estar presente mesmo na ausência de bactérias do grupo coliforme, consideradas indicadoras de contaminação fecal. Nesse sentido, sua pesquisa em águas de piscina e tanques de hidroterapia torna-se um parâmetro básico, de importância fundamental como indicador de risco à saúde dos usuários.

Em indústrias alimentícias, a pesquisa de *S. aureus* assume grande importância na avaliação da qualidade da água utilizada no preparo de alimentos, devido ao fato de ser responsável pela maioria dos casos de intoxicação por ingestão de alimentos e, em indústrias farmacêuticas, sua pesquisa é particularmente importante pela possibilidade de contaminação de cosméticos.

1 OBJETIVO

1.1 Esta Norma prescreve o método de quantificação de *Staphylococcus aureus* pela técnica de membrana filtrante utilizado para:

- a) avaliação da qualidade de águas de piscina, de tanques para hidroterapia e de águas recreacionais naturais;
- b) avaliação da eficiência do tratamento de águas de piscina;
- c) avaliação da qualidade de águas industriais, particularmente de indústrias farmacêuticas.

2 NORMAS COMPLEMENTARES

Na aplicação desta Norma é necessário consultar:

Norma CETESB M1.001 - Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratório de microbiologia.

Norma CETESB L5.215 - Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos.

Norma CETESB L5.216 - Controle de qualidade de meios de cultura.

Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água, CETESB, 1988.

3 DEFINIÇÕES

Para os efeitos desta Norma são adotadas as definições de 3.1 a 3.8.

3.1 *Staphylococcus aureus*

Cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, imóveis, com 0,5 a 1,0 μm de diâmetro, ocorrendo isolados, em pares ou agrupados de modo irregular, produzindo "cachos" de cocos. São catalase e coagulase positivas, fermentam a glicose e o manitol em anaerobiose e produzem uma nuclease estável ao calor.

3.2 Cocos

Designação dada às bactérias que apresentam forma esférica.

3.3 p.a.

Para análise.

3.4 EDTA

Ácido etilenodiaminotetracético.

3.5 N.C. MF/100 mL

Número de colônias por 100 mL (Membrana Filtrante).

3.6 C.cf.

Crescimento confluyente.

3.7 C.P.

Contagem prejudicada.

3.8 q.s.p.

Quantidade suficiente para.

4 APARELHAGEM

4.1 Equipamentos

4.1.1 Balança

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

4.1.2 Banho-maria

Equipado com termostato para temperatura de 55°C, com capacidade suficiente para comportar recipientes contendo meios de cultura, cuja temperatura deve ser estabilizada antes de sua distribuição em placas de Petri.²

4.1.3 Destilador de água ou aparelhos para desionização

Devem produzir água não tóxica, livre de substâncias que impeçam a multiplicação bacteriana ou interfiram nela,³ cuja condutividade deve ser inferior a 2 $\mu\text{S}/\text{cm}^2$ a 25°C e pH na faixa de 5,5 a 7,5.

4.1.4 Equipamentos para esterilização

4.1.4.1 Autoclave

É normalmente operada a uma pressão de 103393 Pa (1,05 kgf/cm² ou 15 lb/pol²) produzindo uma temperatura de 121,6°C, ao nível do mar. Em seu funcionamento deve-se observar a substituição por vapor de todo o ar existente na câmara; a operação total desse equipamento precisa durar no mínimo uma hora. É recomendável que a temperatura de esterilização seja atingida em até 30 minutos.⁴

4.1.4.2 Estufa de esterilização

Mantida a uma temperatura de 170 \pm 10°C durante o período de esterilização (mínimo de duas horas).

1 As balanças devem ser colocadas em local adequado, protegidas de vibrações, umidade e mudanças bruscas de temperatura; precisam ser mantidas limpas e manuseadas por pessoal que conheça seu funcionamento.

2 Devem ser feitos registros contínuos e periódicos da temperatura e os termômetros usados graduados com intervalo de escala de 0,1°C. As estantes a serem colocadas no banho-maria têm que ser de aço inoxidável ou de aço galvanizado.

3 A densidade de bactérias heterotróficas na água recém-destilada deve ser inferior a 1000 unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) e a 10000 UFC/mL na água destilada armazenada, devendo esse controle ser efetuado com frequência mínima mensal (Norma CETESB L5.215).

4 O controle da eficiência da autoclave é feito utilizando-se ampolas com suspensão de *Bacillus stearothermophilus* em meio de cultura, colocando-as entre os frascos ou os materiais a serem esterilizados. Estas ampolas, depois da autoclavagem são incubadas em banho-maria a 55°C durante 24-48 horas. Se houver mudança de coloração da suspensão contida nas ampolas, de roxa para amarela, isso significa que a esterilização foi insuficiente, pois houve desenvolvimento de bactérias.

4.1.5 Equipamento para filtração

4.1.5.1 Fonte de vácuo

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

4.1.5.2 Frasco de filtração

Frasco Kitasato, de parede espessa, com capacidade de 4000 mL.

4.1.5.3 Porta-filtros (ver Figura 1)

De vidro, de plástico autoclavável ou de 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 látex de espessura adequada.

4.1.5.4 Frasco de proteção

Frasco Kitasato 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.

4.1.6 Incubadora bacteriológica termostatizada

Deve manter a temperatura na faixa de $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e a umidade relativa entre 75 e 85%.⁵

4.1.7 Lâmpadas germicidas (ultravioleta)

São lâmpadas que emitem radiação ultravioleta, com ação bactericida. São usadas na descontaminação dos porta-filtros, entre as sucessivas séries de filtração e para a esterilização das placas de Petri de plástico. Para a total eficiência do processo, devem ser observados os seguintes pontos:

- a) as superfícies a serem esterilizadas não devem conter resíduos de nenhuma espécie, pois a poeira acumulada diminui o poder germicida da lâmpada;
- b) a distância entre a lâmpada e a superfície a ser esterilizada deve ser a mínima possível;
- c) deve-se efetuar a limpeza das lâmpadas mensalmente, utilizando-se um pedaço de pano embebido em etanol;
- d) a eficiência da lâmpada germicida deve ser avaliada periodicamente (ver Anexo C-1.2).

4.1.8 Medidor de pH

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

4.1.9 Microscópio estereoscópico binocular

Com aplicação 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.

⁵ A verificação da temperatura deve ser feita periodicamente (mínimo de duas vezes ao dia) através de termômetros (com o bulbo submerso em água, glicerina ou óleo mineral) colocados em pontos representativos da incubadora, sendo aconselhável também a colocação de um termômetro de máxima e mínima na sua parte central. A estratificação da temperatura na incubadora pode ser evitada através da colocação, em seu interior, de um dispositivo para circulação do ar.

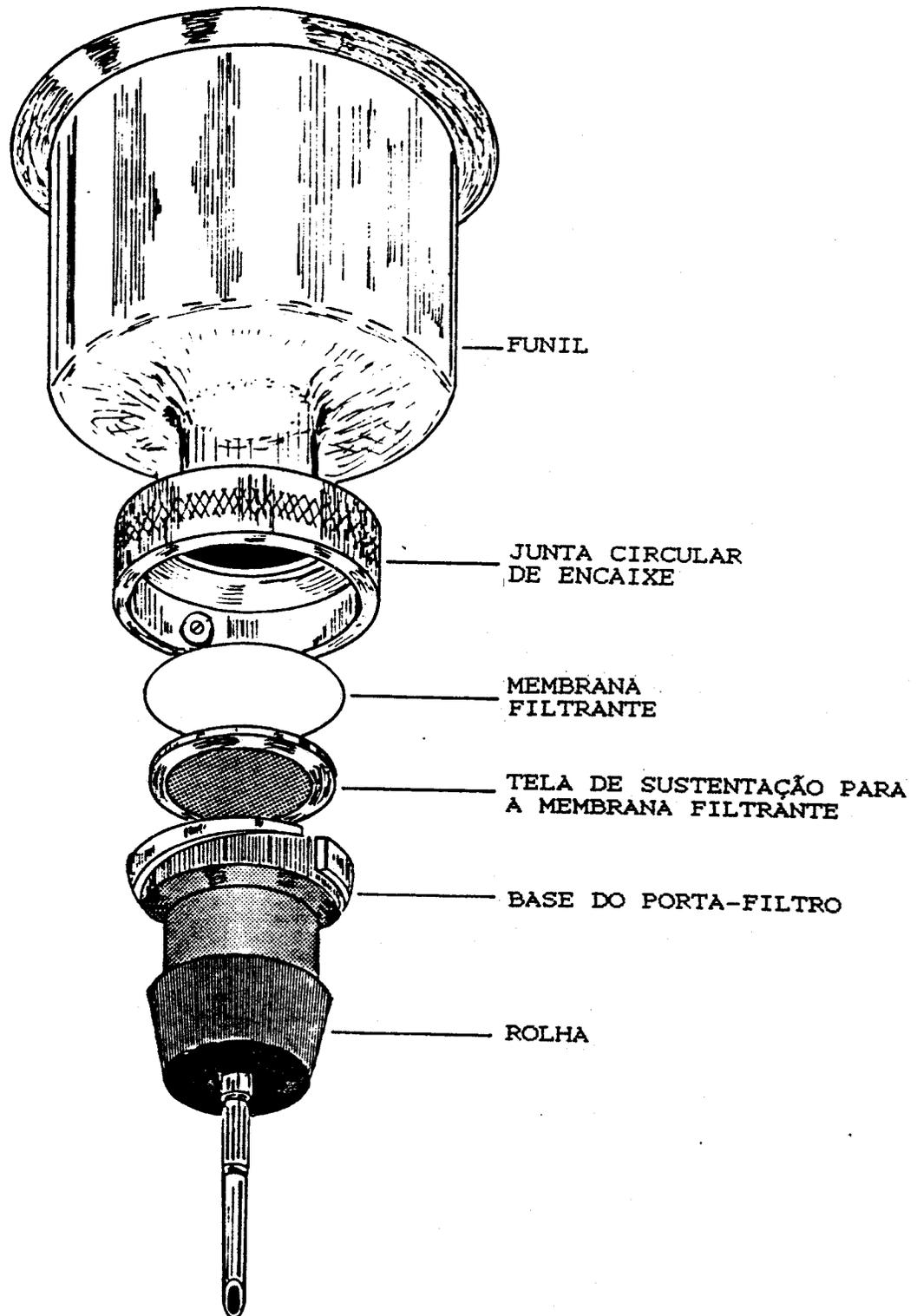


FIGURA 1 - Unidade de filtração

4.1.10 Refrigerador

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

4.2 Vidraria

4.2.1 Balões

De borossilicato ou de vidro neutro, com capacidade adequada para o preparo de meios de cultura.

4.2.2 Frascos para água de diluição

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

4.2.3 Frascos para coleta de amostras

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

4.2.4 Frascos de erlenmeyer

Devem ser de borossilicato ou de vidro neutro, com capacidade de 100 mL e 1 L.

4.2.5 Pipetas

Pipetas do tipo Mohr de 1 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.

4.2.6 Provetas graduadas de 100 mL

4.2.7 Tubos de ensaio

De borossilicato ou de vidro neutro.

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 70 a 80 mm de comprimento, fixado a um cabo metálico (cabo de Kolle).

4.3.2 Bico de Bunsen ou similar

Deve ter funcionamento adequado de modo a produzir combustão completa.

4.3.3 Caixas ou cestas de aço inoxidável

Para esterilização de materiais.

4.3.4 Caixas de Huddlenson

Para teste de aglutinação rápida. Caixa de madeira pintada internamente de preto, salvo uma face, pintada de branco, provida de uma lâmpada e uma placa de vidro quadriculada.

4.3.5 Estantes

De tamanho adequado para a colocação dos tubos de ensaio empregados na análise.

4.3.6 Estojo para pipetas

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

4.3.7 Membranas filtrantes estéreis

De 47 mm de diâmetro, com porosidade de 0,45 μm (brancas, quadriculadas) e de 0,20 μm (brancas).

4.3.8 Papel alumínio

4.3.9 Papel Kraft

4.3.10 Pinças

De aço inoxidável, com extremidades arredondadas.

4.3.11 Placas de Petri de plástico

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

4.3.12 Tela de amianto

4.3.13 Termômetros

4.3.14 Tripé

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 0,45 μm . As bactérias 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 de Baird-Parker). Por capilaridade, o meio se difundirá para a membrana, entrando em contato com as bactérias e, após um período de incubação de 48 horas a 35°C, se desenvolverão, na superfície da membrana, colônias com características típicas (colônias negras, brilhantes, convexas, com diâmetro de aproximadamente 1 a 4 mm geralmente rodeadas por um halo claro), que poderão ser observadas com auxílio de um microscópio estereoscópico. A partir da confirmação dessas colônias na pesquisa da produção de catalase e coagulase, calcula-se a densidade de *Staphylococcus aureus* presente na amostra.

5.2 Reagentes

5.2.1 Para a preparação dos meios de cultura e soluções são necessários os seguintes reagentes:

- a) ácido etilenodiaminotetracético, sal dissódico (EDTA);
- b) ágar;

- c) água destilada;
- d) álcool etílico (etanol) p.a.;
- e) cloreto de lítio (LiCl) p.a.;
- f) cloreto de magnésio ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) p.a.;
- g) cloreto de sódio (NaCl) p.a.;
- h) extrato de carne;
- i) extrato de levedura;
- j) fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) p.a.;
- k) fosfato de sódio monobásico (KH_2PO_4) p.a.;
- l) gema de ovo;
- m) glicina (H_2NCH_2COOH) p.a.;
- n) glicose (dextrose) p.a.;
- o) hidróxido de sódio (NaOH) p.a.;
- p) infusão de cérebro de vitela;
- q) infusão de coração;
- r) plasma de coelho e/ou humano;
- s) peróxido de hidrogênio (H_2O_2) p.a.;
- t) piruvato de sódio ($C_3H_3NaO_3$);
- u) proteose-peptona p.a.;
- v) telurito de potássio (K_2TeO_3) p.a.;
- x) tiosulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$) p.a.; e
- z) triptona p.a.

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

5.3 Meios de cultura

5.3.1 Meio ágar de Baird-Parker

Fórmula:

Ágar base de Baird-Parker.....	950 mL
Emulsão de gema de ovo.....	50 mL
Solução de telurito de potássio 3.5%.....	3 mL

5.3.1.1 Ágar base de Baird-Parker

Fórmula:

Triptona.....	10,0 g
Extrato de carne.....	5,0 g
Extrato de levedura.....	1,0 g
Glicina p.a.....	12,0 g
Piruvato de sódio.....	10,0 g
Cloreto de lítio (LiCl) p.a.....	5,0 g
Ágar.....	20,0 g
Água destilada.....	950 mL

Preparo:

Pesar 63 g do meio desidratado "Baird-Parker Ágar Base" e acrescentar 950 mL de água destilada fria. Deixar em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer, agitando frequentemente até a completa dissolução do meio. Ajustar o pH para 7.0 ± 0.2 . Esterilizar em autoclave a $121^\circ C$ durante 15 minutos. Após esterilização, manter o meio preparado em banho-maria a $45^\circ C$ a $50^\circ C$, para estabilização da temperatura até o momento da adição da emulsão de gema de ovo e da solução de telurito de potássio a 3.5%.

5.3.1.2 Emulsão de gema de ovo

Fórmula:

Gema de ovo.....	50 mL
Solução salina a 0,85%.....	50 mL

Preparo:

Lavar os ovos frescos de galinha e colocar em álcool etílico a 70% por aproximadamente 60 minutos. Retirar os ovos com o auxílio de uma colher e, em seguida, flambar para eliminar o excesso de álcool. Quebrar os ovos assepticamente, separando as gemas em frasco esterilizado. Desprezar as claras. Homogeneizar e medir 50 mL da gema. Acrescentar 50 mL de solução salina a 0,85%. Misturar com cuidado para evitar formação de espuma, guardar em frasco bem vedado, sob refrigeração (2°C a 8°C).

5.3.1.3 Solução de telurito de potássio a 3,5%

Fórmula:

Telurito de potássio (K ₂ TeO ₃).....	3,5 g
Água destilada q.s.p.....	100 mL

Preparo:

Pesar 3,5 g de telurito de potássio, colocar em um balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água destilada fria. Homogeneizar e esterilizar por filtração em membrana filtrante com porosidade de 0,20 µm. Guardar em frasco bem vedado, sob refrigeração (2°C a 8°C).

5.3.1.4 Preparo final do meio ágar de Baird-Parker

Adicionar assepticamente ao ágar base de Baird-Parker estabilizado a 45°C a 50°C, 50 mL de emulsão de gema de ovo e 3 mL da solução de telurito de potássio a 3,5%. Homogeneizar e distribuir volumes de 3 mL em placas de Petri de plástico de 48 mm x 8,5 mm. Armazenar as placas de Petri contendo o meio ágar de Baird-Parker sob refrigeração (2°C a 8°C) durante um período de 48 horas.

5.3.2 Ágar infusão de cérebro e coração (Ágar BHI)

Fórmula:

Infusão de cérebro de vitela.....	200,0 g
Infusão de coração.....	250,0 g
Proteose-peptona.....	10,0 g
Glicose.....	2,0 g
Cloreto de sódio (NaCl) p.a.....	5,0 g
Fosfato de sódio dibásico (K ₂ HPO ₄) p.a.....	2,5 g
Ágar.....	15,0 g
Água destilada.....	1000 mL
pH final após esterilização: 7,4 ± 0,2	

Preparo:

Pesar 52,0 g do meio desidratado "Brain Heart Infusion Agar" e acrescentar 1000 mL de água destilada fria, deixando em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Ajustar o pH para 7,4 ± 0,2. Distribuir volumes de 4 mL a 5 mL em tubos de ensaio de 12 mm x 120 mm. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Após esterilização, conservar os tubos em posição inclinada até solidificação do meio. Armazenar sob refrigeração (2°C a 8°C).

5.4 Soluções

5.4.1 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 ± 0.1	

5.4.1.1 Solução-estoque A

Fórmula:

Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) p.a.....	34.0 g
Água destilada q.s.p.....	1000 mL

Preparo:

Dissolver o fosfato de potássio monobásico em 500 mL de água destilada, ajustar o pH para 7.2 ± 0.1 com solução de hidróxido de sódio 1 N e completar o volume para um litro com água destilada. Distribuir, em frascos com tampa de rosca, volumes que sejam adequados à necessidade de uso do laboratório. Esterilizar em autoclave a 121°C , durante 15 minutos. Armazenar em geladeira (2°C a 8°C).

5.4.1.2 Solução-estoque B

Fórmula:

Cloreto de magnésio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) p.a.....	81.1 g
Água destilada q.s.p.....	1000 mL

Preparo:

Pesar 81.1 g de cloreto de magnésio, colocar em um balão volumétrico. Acrescentar 500 mL de água destilada, homogeneizar e, após dissolução, completar o volume para 1000 mL. Distribuir, em frascos com tampa de rosca, volumes que sejam adequados à necessidade de uso do laboratório. Armazenar em geladeira (2°C a 8°C).

5.4.1.3 Preparo final da água de diluição

Adicionar 1,25 mL da solução-estoque A e 5 mL da solução-estoque B a 1000 mL de água destilada. Distribuir em frascos de diluição quantidades adequadas que assegurem, após autoclavagem a 121°C durante 15 minutos, volumes de (90 ± 2) mL. Armazenar à temperatura ambiente.

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.

5.4.2 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 e colocar em um balão volumétrico de um litro e homogeneizar em pequenos volumes de água e, após dissolução, completar o volume para 1000 mL com água destilada. Armazenar em frascos bem vedados à temperatura ambiente.

5.4.3 Solução de tiossulfato de sódio a 1.8%**Fórmula:**

Tiossulfato 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 tiossulfato de sódio, colocar em um balão volumétrico de um litro e homogeneizar em pequenos volumes de água e, após dissolução, completar o volume para 1000 mL com água destilada. Armazenar em frascos bem vedados à temperatura ambiente.

5.4.4 Solução de EDTA a 15%**Fórmula:**

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

Preparo:

Pesar 150 g de EDTA, colocar em balão volumétrico de um litro e homogeneizar em pequeno volume de água e, após dissolução, completar o volume para 1000 mL com água destilada. Ajustar o pH para 6.5. Armazenar em frasco bem vedado à temperatura ambiente.

5.4.5 Solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3%**Fórmula:**

Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) p.a.....	3 mL
Água destilada q.s.p.....	1000 mL

Preparo:

Colocar 3 mL de peróxido de hidrogênio em um balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água destilada. Misturar através de agitação. Armazenar em frascos bem vedados sob refrigeração (2°C a 8°C).

5.4.6 Solução salina de cloreto de sódio a 0.85%**Fórmula:**

Cloreto de sódio (NaCl) p.a.....	8,5 g
Água destilada q.s.p.....	1000 mL

Preparo:

Pesar 8,5 g de cloreto de sódio e colocar em um balão volumétrico de um litro. Homogeneizar em pequenos volumes de água destilada e, após dissolução do cloreto de sódio, completar o volume para 1000 mL. Distribuir, em frascos com tampas de rosca, volumes que sejam adequados à necessidade de uso do laboratório. Armazenar à temperatura ambiente.

5.5 Reações

5.5.1 Reações no meio ágar de Baird-parker

Os inibidores cloreto de lítio e telurito de potássio atuam como supressores do crescimento de organismos não desejados, e o piruvato e a glicina favorecem seletivamente o crescimento de estafilococos. O telurito e os componentes da gema do ovo são responsáveis pela diferenciação de estafilococos coagulase-positiva pela formação de colônias convexas, de cor negra, brilhantes, geralmente rodeadas por uma zona transparente, diferenciando dos estafilococos coagulase-negativa. O crescimento deste último observa-se ocasionalmente, e as colônias que aparecem depois de 24 horas de incubação a 35°C, distinguem-se pela sua aparência irregular. *Proteus* e espécies de *Bacillus* podem crescer, mas como colônias de cor marrom.

5.5.2 Pesquisa de catalase

A catalase é uma enzima que catalisa a reação em que atuam duas moléculas de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma como doadora de hidrogênio e outra, como receptora. Sua presença na bactéria, ao ser adicionado o peróxido de hidrogênio sobre uma suspensão da cultura, é evidenciada pela liberação de oxigênio (O_2), havendo formação de bolhas de gás.

5.5.3 Pesquisa da coagulase

A coagulase é uma enzima produzida por *Staphylococcus aureus* que, reagindo com um cofator existente no plasma de certas espécies (coelho, cavalo, homem), transforma o fibrinogênio em fibrina. *Staphylococcus aureus* produz dois tipos de coagulase: livre e conjugada. A coagulase livre é uma enzima extracelular produzida quando o organismo é cultivado em caldo. A coagulase conjugada, também conhecida como fator aglutinante, encontra-se aderida à parede celular do organismo (coagulase em lâmina). A pesquisa da coagulase é o critério mais amplamente utilizado para a diferenciação entre as espécies do gênero *Staphylococcus*, sendo o resultado positivo neste teste um parâmetro fundamental para a perfeita caracterização de *Staphylococcus aureus*.

5.6 Amostragem

Deve ser realizada conforme descrito no Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água, CETESB, 1988.

5.6.1 Amostra

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

5.6.1.2 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. Nesses 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.

5.6.1.3 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 tiossulfato 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 tiossulfato de sódio antes da adição. O EDTA atua como agente quelante, reduzindo a ação tóxica de metais, apresentando uma ação mais ampla que o tiossulfato de sódio, o qual, na concentração empregada, previne apenas a ação bactericida do cobre.

5.6.1.4 Transporte e conservação: após a coleta, a amostra deve ser enviada ao laboratório o mais rápido possível. O tempo máximo ideal entre a coleta da amostra e o início do exame é de oito horas, sendo que o tempo limite não deve exceder 24 horas para águas brutas e 30 horas para águas tratadas. As amostras devem ser transportadas sob refrigeração (4°C a 10°C) e conservadas assim até o início do exame.

5.7 Procedimento

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

5.7.2 Dispor sobre a bancada de trabalho o material necessário para a execução da análise, a saber:

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

5.7.2.2 Placas de Petri de 48 mm x 8,5 mm, contendo o meio Ágar de Baird-Parker identificadas com o n° da amostra, o volume a ser filtrado e a data.

5.7.2.3 Provetas graduadas estéreis, com a abertura recoberta com papel alumínio, identificadas com o n° da amostra.

5.7.2.4 Água de diluição estéril, contida em balões identificados com o n° do porta-filtro, para cuja enxaguadura serão utilizados.

5.7.2.5 Pinças com as extremidades mergulhadas em álcool.

5.7.2.6 Membranas filtrantes estéreis, com 47 mm de diâmetros, porosidade de 0,45 µm, brancas, quadriculadas.

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

5.7.3 Preparação do porta-filtro

5.7.3.1 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.

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

5.7.4 Preparação da amostra para a filtração

5.7.4.1 Para volumes iguais ou superiores a 20 mL:

- a) homogeneizar a amostra, por agitação manual, inclinando frasco (formando um ângulo de aproximadamente 45° entre

- o braço e o antebraço) e agitando vigorosamente: repetir a operação no mínimo 25 vezes;
- b) distribuir volumes requeridos da amostra em provetas estéreis e proceder à filtração como em 5.7.5.

5.7.4.2 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 5.7.4.1-a) e, com o auxílio de uma pipeta estéril, retirar o volume desejado e proceder à filtração como em 5.7.5.

5.7.4.3 Para volumes decimais (diluições 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 n^o da amostra e a diluição que deverá conter;
 - homogeneizar a amostra (como em 5.7.4.1-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 ± 2) mL de água de diluição estéril. Estará preparada assim a primeira diluição decimal (10⁻¹), sendo que 1 mL dela corresponde ao volume de 0,1 mL da amostra;
 - repetir a operação segundo o item anterior, com o frasco contendo a diluição feita anteriormente (10⁻¹) e desta, com uma nova pipeta estéril de 10 mL, transferir 10 mL para um novo frasco, previamente identificado, contendo (90 ± 2) mL de água de diluição estéril. Prepara-se assim a segunda diluição decimal (10⁻²), sendo que 1 mL da mesma corresponde ao volume de 0,01 mL da amostra;
 - proceder dessa maneira na seqüência das diluições desejadas (10⁻³, 10⁻⁴, ..., 10⁻⁸, ...);
- b) após o preparo das diluições, preparar o porta-filtro (como descrito em 5.7.4.2-a) e, após homogeneização da diluição selecionada para filtração (conforme 5.7.4.1-a) retirar o volume desejado com uma pipeta estéril e proceder à filtração como em 5.7.5.

5.7.5 Filtração dos volumes da amostra

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

5.7.5.2 Ligar a bomba de vácuo e proceder à filtração.

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

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

5.7.6 Colocar a placa de Petri correspondente contendo o meio Ágar de Baird-Parker em frente ao conjunto de filtração e, com o auxílio de uma pinça, entreabri-la.

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

5.7.8 Obedecendo aos cuidados de assepsia, colocar cuidadosamente a membrana, com a superfície quadriculada voltada para cima, na superfície do meio ágar de Baird-Parker, contido na placa de Petri (ver Figura 2).

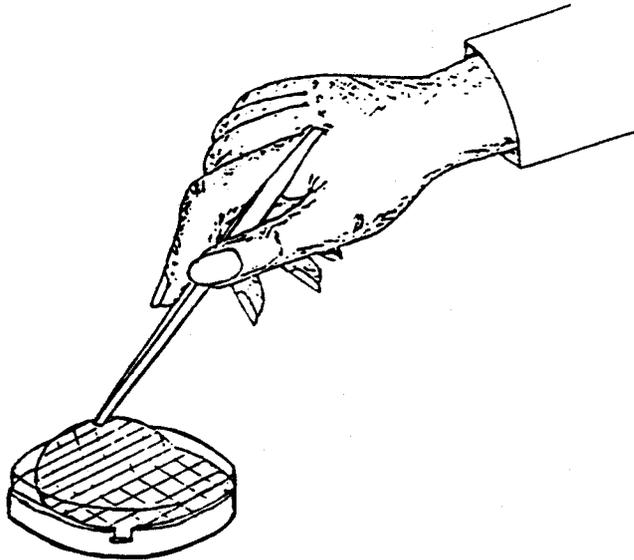


FIGURA 2 - Colocação da membrana filtrante na superfície do meio de cultura

5.7.9 Verificar se houve formação de bolhas de ar entre a membrana e o meio de cultura. Se isso 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.

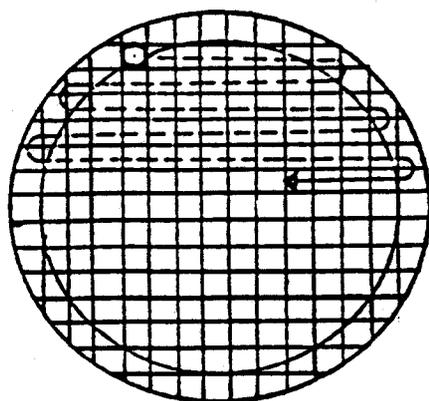
5.7.10 Lavar novamente o porta-filtro com água de diluição estéril e proceder à próxima filtração.

- Notas:**
- a) 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 pode ser efetuada pelos seguintes processos:
 - exposição à radiação ultravioleta durante dois minutos;
 - imersão em água fervente, durante 30 minutos, no mínimo
 - b) Visando o controle de esterilidade de cada porta-filtro 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 dez amostras filtradas no mesmo porta-filtro.

5.7.11 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 de papel 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°C durante 48 horas.

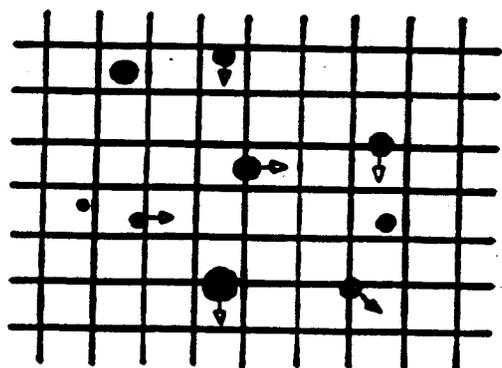
5.7.12 Após o período de incubação, retirar as placas da incubadora e efetuar as contagens, selecionando para a leitura, entre os volumes filtrados de cada amostra, aquele que tiver fornecido contagem entre 20 a 60 colônias típicas de *Staphylococcus aureus* apresentam-se convexas, de cor negra, brilhantes, geralmente rodeadas por um halo ou zona transparente com diâmetro aproximado de 1 mm a 1.5 mm.

5.7.13 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

5.7.14 Após a contagem e registro do número de colônias típicas de *Staphylococcus aureus*, selecionar um número adequado delas para serem submetidas à confirmação, procedendo-se da seguinte forma:

5.7.14.1 Se o número de colônias típicas de *Staphylococcus aureus* for igual ou inferior a dez, submeter todas à confirmação.

5.7.14.2 Se o número de colônias típicas de *Staphylococcus aureus* for superior a dez, selecionar dez colônias para serem submetidas a confirmação.

5.7.15 Proceder à confirmação para *Staphylococcus aureus* em ágar infusão de cérebro e coração (ágar BHI) como segue:

5.7.15.1 A partir do número de colônias típicas de *Staphylococcus aureus* determinado para verificação, identificar os tubos de ágar BHI, de tal modo que para cada colônia corresponda um tubo de ágar.

5.7.15.2 Flambar e resfriar uma alça de inoculação (fio de platina ou de níquel-cromo).

5.7.15.3 Com a alça, colher um inóculo da colônia a ser submetida à confirmação.

5.7.15.4 Através de estrias, transferir o inóculo de cada colônia típica selecionada para a superfície do meio de ágar BHI, previamente identificado.

5.7.15.5 Incubar durante 24 horas à temperatura de $(35 \pm 0,5)^\circ\text{C}$.

5.7.15.6 Após o período determinado de incubação, a partir das culturas em ágar BHI, efetuar o teste para a pesquisa da catalase e coagulase:

a) teste para pesquisa da catalase:

A partir do crescimento em ágar BHI, transferir, com uma alça de inoculação, uma pequena quantidade da cultura para uma lâmina de vidro e, sobre ela, adicionar algumas gotas de peróxido de hidrogênio a 3%. A formação de bolhas constitui teste de catalase positivo, indicando provável presença de estafilococos. A ausência de bolhas constitui teste de catalase negativo, indicando a presença de outras espécies de bactérias. Dar seqüência ao teste para pesquisa da coagulase com as culturas que apresentarem resultado positivo no teste para a pesquisa da catalase e descartar as demais.

Nota: Para a realização do teste, usar sempre, como controle, uma cultura catalase-positiva (*Staphylococcus aureus*) e uma cultura catalase-negativa (*Staphylococcus faecalis*).

b) teste para pesquisa da coagulase:

Pode ser realizada através do método em lâmina (coagula-se conjugada) ou do método em tubo (coagulase livre).

- Técnica da coagulase em lâmina (coagulase conjugada)

A partir do crescimento em ágar BHI, transferir, com uma alça de inoculação, uma pequena quantidade da cultura para uma lâmina de vidro ou placa de vidro quadriculada adaptada a uma caixa de Huddlenson e, sobre ela, adicionar uma gota de solução salina de NaCl a 0,85%. Emulsionar de maneira a formar uma

suspensão bacteriana densa e uniforme. Adicionar uma gota de plasma de coelho com EDTA à suspensão e homogeneizar com movimentos circulares por 15 segundos. A formação de grumos macroscópicos constitui teste positivo para coagulase, indicando a presença de *Staphylococcus aureus*. A ausência de grumos ou uma aglutinação tardia constitui teste negativo para coagulase. Qualquer evidência de auto-aglutinação (grumos na suspensão bacteriana em solução salina) antes da adição do plasma, trata-se de reação inespecífica, devendo ser utilizado o teste da coagulase em tubo. Para realização do teste, usar sempre, como controle, uma cultura coagulase-negativa (*S. epidermidis*).

- Técnica da coagulase em tubo (coagulase livre)

A partir do crescimento da cultura de 24 horas em ágar BHI, transferir, com uma alça de inoculação, devidamente flambada e esfriada, uma porção da cultura em teste para um tubo de ensaio estéril de 12 mm x 120 mm, previamente identificado, contendo 0,3 mL de plasma de coelho com EDTA. Dissolver bem o inóculo da cultura, atritando a ponta da alça na parede do tubo. Incubar em banho-maria a 37°C pelo tempo de quatro a 24 horas. Paralelamente, usar como controle uma cultura coagulase-positiva (*S. aureus*), uma cultura coagulase-negativa (*S. epidermidis*) e o controle do plasma de coelho com EDTA (branco), utilizando o mesmo procedimento descrito. Examinar periodicamente para verificar a ocorrência da coagulase, inclinando suavemente o tubo depois da primeira hora e a cada hora, até que sejam transcorridas quatro horas; comparar com os controles. Se necessário, voltar a incubar e examinar em 24 horas. Evitar agitar e mover o tubo durante a leitura, pois pode gerar resultados duvidosos ou falsos negativos devido à decomposição do coágulo. Anotar a intensidade da coagulação do Plasma (Figura 5).



FIGURA 5 - Ilustração da intensidade de coagulação do plasma

As culturas com reação na qual há uma nítida e firme formação de coágulo (reações 3+ e 4+) são consideradas positivas para confirmação de *S. aureus*. Para as culturas com reações 1+ e 2+, nas quais não há formação nítida de coágulo, recomenda-se a execução de provas complementares para uma melhor caracterização de *S. aureus* (ver A-1 e A-2).

Nota: A leitura da prova da coagulase a cada hora durante as quatro primeiras horas de incubação se faz necessária devido a algumas cepas de *S. aureus* produzirem fibrinolisinase, que pode lisar os coágulos formados anteriormente. Se os tubos não forem lidos até 24 horas de incubação, poderá dar lugar a reversão de um falso negativo.

5.7.16 A partir do número de colônias confirmadas como *Staphylococcus aureus*, calcular a densidade dessas bactérias conforme 6.2.

6 RESULTADOS

6.1 A densidade de *Staphylococcus aureus* determinada através da técnica de membrana filtrante é expressa como: número de colônias de *Staphylococcus aureus* por 100 mL. O número de *Staphylococcus aureus* é obtido a partir do número de colônias que, submetidas ao teste de confirmação, apresentaram resultados positivos.

6.2 A determinação da densidade de *Staphylococcus aureus* a partir do número de colônias típicas com resultado confirmativo positivo é feita através da aplicação da seguinte fórmula geral:

$$\text{NC.NF de Staphylococcus aureus/100 mL} = \frac{\text{Nº de colônias típicas com resultado confirmativo positivo}}{\text{volume filtrado da amostra (mL)}} \times 100$$

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 *Staphylococcus aureus* na membrana filtrante é igual ou inferior a dez, 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 ágar de Baird-Parker = 10;
- b) total de colônias submetidas à confirmação = 10;
- c) total de colônias com resultado confirmativo positivo = 6;
- d) expressão do resultado final:

$$\text{NC.NF de Staphylococcus aureus/100 mL} = \frac{6}{\text{volume filtrado da amostra}} \times 100$$

6.3.2 Na situação em que a contagem de colônias típicas de *Staphylococcus aureus* na membrana filtrante é superior a dez, somente dez 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 ágar Baird-Parker = 30;
- b) número de colônias submetidas à 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:

$$\text{NC.MF de } \textit{Staphylococcus aureus}/100 \text{ mL} = \frac{18}{\text{volume filtrado da amostra}} \times 100$$

6.4 Estes cálculos requerem a consideração prévia dos seguintes itens quanto à seleção das placas para ser efetuada a contagem de colônias típicas:

6.4.1 Leitura das placas com contagens dentro dos limites aceitáveis (20 a 60 colônias típicas):

6.4.1.1 Quando apenas um volume filtrado fornece contagem aceitável: considere-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 *Staphylococcus aureus* em 100 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:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de colônias}/100 \text{ mL} = \frac{40}{10} \times 100$$

O resultado final será expresso como:

$$\text{NC.MF de } \textit{Staphylococcus aureus}/100 \text{ mL} = 400$$

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.

6.4.1.2 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 100 mL, segundo a fórmula apresentada no item 6.2, e o resultado final em 100 mL será obtido a partir do cálculo da média aritmética entre estes 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 mL e 0,05 mL) forneceram contagens dentro dos limites aceitáveis. Considerando-se que a porcentagem de confirmação das colônias típicas tenha sido 100%, calcular o resultado para 100 mL independentemente para cada uma dessas contagens:

$$\frac{60}{0,1} \times 100 = 60000/100 \text{ mL}$$

$$\frac{28}{0.05} \times 100 = 56000/100 \text{ mL}$$

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

$$\frac{60000 + 56000}{2} = 58000$$

O resultado final será expresso como:

$$\text{NC.MF de } \textit{Staphylococcus aureus}/100 \text{ mL} = 58000$$

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.

6.4.2 Leitura das placas com contagem fora dos limites aceitáveis:

6.4.2.1 Quando todos os volumes filtrados fornecerem contagens inferiores a 20 colônias típicas de *Staphylococcus aureus*: 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:

$$\text{NC.MF de } \textit{Staphylococcus aureus}/100 \text{ mL} = \frac{\text{soma das contagens de colônias típicas com resultado confirmativo positivo}}{\text{soma dos volumes correspondentes às contagens}} \times 100$$

Exemplificando:

- a) volumes em duplicata de 50 mL de uma amostra forneceram contagens de cinco e três colônias. Se a porcentagem de confirmação das colônias típicas tiver sido 100%, o resultado será obtido a partir do seguinte cálculo:

$$\frac{(5 + 3)}{(50 + 50)} \times 100$$

O resultado final será expresso como:

$$\text{NC.MF de } \textit{Staphylococcus aureus}/100 \text{ mL} = 8$$

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

- b) volumes de 50 mL, 25 mL e 10 mL de uma amostra forneceram, respectivamente, as contagens 15, 6 e <1 colônias.

$$\frac{(15 + 6 + 0)}{(50 + 25 + 10)} \times 100$$

O resultado final será expresso como:

$$\text{NC.MF de } \textit{Staphylococcus aureus}/100 \text{ mL} = 25$$

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

6.4.2.2 Quando todos os volumes fornecerem contagens superiores a 60 colônias típicas; neste caso, efetuar a contagem apenas no menor volume filtrado. Para o cálculo do resultado em 100 mL, aplicar a fórmula geral (item 6.2) e expressar o resultado como > (maior que) o valor obtido.

Exemplificando:

volumes de 0.3 e 0.1 mL forneceram, respectivamente, contagens de 205 e 68 colônias típicas. Se a porcentagem de confirmação das colônias tiver sido 100%, o resultado será obtido a partir do seguinte cálculo:

$$\frac{68}{0.1} \times 100$$

O resultado final será expresso como:

NC.MF de *Staphylococcus aureus*/100 mL > 68000

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

6.4.2.3 Quando todos os volumes filtrados fornecerem contagens iguais a zero:

- a) quando os volumes filtrados não totalizam 100 mL; neste caso, para expressar o resultado final, considerar como sendo um o número de colônias no maior volume filtrado e usar a fórmula geral (item 6.2), para cálculo do número de colônias em 100 mL. Para a expressão do resultado final, utilizar o valor obtido nesse cálculo, precedido do sinal < (menor que).

Exemplificando:

volumes de 25 mL, 10 mL e 2 mL de uma amostra forneceram, todos eles, contagens iguais a zero. Considerando como um a contagem no maior volume filtrado (25 mL), aplicar a fórmula geral:

$$\frac{1}{25} \times 100 = 4$$

O resultado final será expresso como:

NC.MF de *Staphylococcus aureus*/100 mL < 4

- b) quando os volumes filtrados totalizam 100 mL; neste caso, o resultado é expresso como < 1/100 mL. Considerando que volumes de 75, 20 e 5 mL de uma amostra forneceram, todos eles, contagens iguais a zero, para o cálculo do resultado em 100 mL aplicar a fórmula:

$$\frac{1}{75 + 20 + 5} \times 100$$

O resultado final será expresso como:

NC.MF de *Staphylococcus aureus*/100 mL < 1

6.4.2.4 Quando a soma total de colônias é superior a 200: relatar o resultado final como Contagem Prejudicada (C.P.).

6.4.3 Quando houver crescimento em toda a área de filtração da membrana, sem colônias bem definidas, relatar o resultado final como Crescimento Confluyente (C.cf.).

6.4.4 Nos casos especificados nos itens 6.4.2.4 e 6.4.3 relativos à Contagem Prejudicada e Crescimento Confluyente, deve-se solicitar a coleta da amostra e selecionar volumes mais adequados para filtração. Assim, para águas tratadas, uma filtração de 100 mL pode ser substituída por duas filtrações de 50 mL ou 4 de 25 mL. Para a leitura, efetuar a contagem das colônias em todas as placas correspondentes aos volumes filtrados, considerando o número obtido como o total de colônias em 100 mL da amostra.

/ANEXO A

/ANEXO A

**ANEXO A - ESQUEMA DO PROCEDIMENTO E TESTES COMPLEMENTARES
PARA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

É recomendável que, periodicamente, sejam efetuados testes complementares de um número significativo de colônias isoladas em ágar BHI e confirmadas nas pesquisas da catalase e coagulase, para avaliar a eficiência da técnica. Para essa finalidade é recomendada a seqüência de testes mostrada na Figura 6.

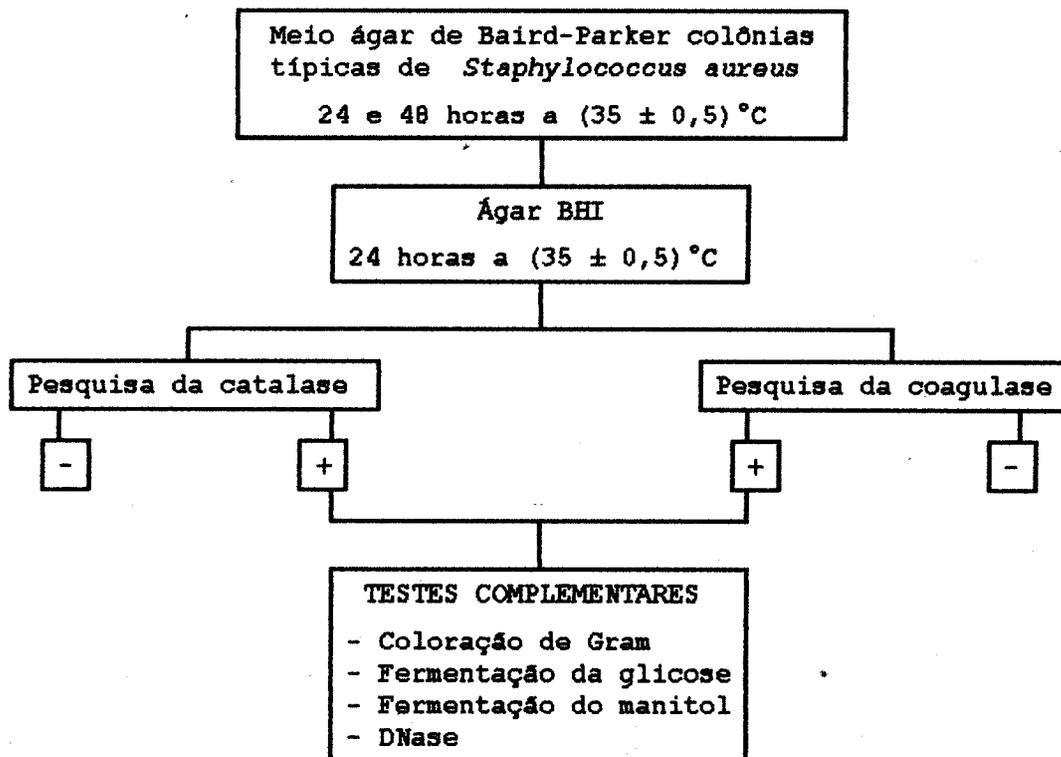


FIGURA 6 - Esquema do procedimento

O procedimento para a realização dos testes complementares, assim como dos meios de cultura e soluções, estão descritos respectivamente nos itens A-1 e A-2.

A-1 A partir de cada cultura de 24 horas em ágar BHI identificadas como *Staphylococcus aureus*, realizar as provas complementares de A-1.1 a A-1.4.

A-1.1 Coloração de Gram

A-1.1.1 Preparo do esfregaço:

- limpar bem a lâmina de vidro para livrá-la de qualquer traço de película oleosa;
- colocar uma gota de solução salina de NaCl a 0,85% sobre a lâmina;
- com uma alça de inoculação, colher uma pequena quantidade de crescimento bacteriano na superfície do ágar inclinado e suspendê-la na gota de solução salina;
- com a ponta da alça de inoculação, espalhar sobre a lâmina de modo a formar uma película bem fina, deixar secar;

- fixar o esfregaço, passando a lâmina três vezes sobre uma chama.

A-1.1.2 Para a coloração pelo método de Gram, proceder da seguinte forma:

- cobrir o esfregaço durante um minuto com solução de cristal violeta;
- remover o excesso da solução de cristal violeta da lâmina, lavando-a levemente com água corrente;
- cobrir o esfregaço com solução de lugol durante um minuto;
- decolorar o esfregaço, usando uma solução de álcool-acetona (1:1);
- cobrir o esfregaço, durante 15 segundos, com solução de safranina diluída;
- lavar a lâmina em água corrente e enxugá-la delicadamente com papel filtro, através de leve compressão sobre a lâmina.

A-1.1.3 Examinar as lâminas ao microscópio usando objetiva de imersão. *Staphylococcus aureus* apresenta-se, nessa coloração, como cocos Gram-positivos (corados em roxo), podendo ocorrer na forma de cacho de uva ou em cadeias curtas.

A-1.2 Teste da fermentação da glicose, segundo Hugh & Leifson

Para o teste de fermentação, os tubos contendo o meio de Hugh & Leifson, com glicose, são previamente aquecidos em banho-maria durante aproximadamente dez minutos, para remover o ar existente em seu interior, e são esfriados rapidamente antes do uso. Inocular pelo procedimento de picada em profundidade. Logo após a inoculação, acrescentar algumas gotas de vaselina líquida estéril a fim de formar uma camada de aproximadamente 5 mm sobre a superfície do meio. Incubar a 35°C e observar diariamente durante aproximadamente cinco dias. A fermentação da glicose é evidenciada pela viragem do indicador de verde para amarelo, em decorrência da acidificação do meio, considerando:

- a) coloração verde: prova negativa;
- b) coloração amarela: prova positiva.

A-1.3 Teste da fermentação do manitol, segundo Hugh & Leifson

Proceder de acordo com A-1.2, utilizando tubos contendo o meio de Hugh & Leifson com manitol. A fermentação do manitol é evidenciada pela viragem do indicador de verde para amarelo, em decorrência da acidificação do meio, considerando:

- a) coloração verde: prova negativa;
- b) coloração amarela: prova positiva.

A-1.4 Teste para pesquisa da desoxirribonuclease (DNase). Método de Gilardi

Com uma alça de inoculação devidamente flambada e esfriada, transferir um inóculo do crescimento de 18 a 24 horas em ágar BHI para uma placa com o meio de cultura contendo DNA mais o indicador azul de o-toluidina. A inoculação é feita através de três picadas ou estrias em uma área da placa, previamente marcada. Incubar a placa por 24 horas, a (35 ± 0.5)°C. A atividade da enzima é evidenciada por um halo róseo ao redor da sementeira, indicando hidrólise do DNA. A ausência do halo róseo em torno da cultura indica resultado negativo. Para a realização do teste, usar sempre, como controle, uma cultura de *S. aureus* (DNase positiva) e *Enterobacter* sp. (DNase negativa).

A-2 Meios de cultura e soluções para realização das provas complementares

A-2.1 Reagentes para coloração de Gram

A-2.1.1 Solução de cristal violeta

Fórmula:

- Solução A	
Cristal violeta.....	2,0 g
Álcool etílico, 95%.....	20,0 mL
- Solução B	
Oxalato de amônio.....	0,8 g
Água destilada.....	80,0 mL

Preparo:

Misturar as soluções em partes iguais, 24 horas antes do uso, filtrando através de papel de filtro.

A-2.1.2 Solução de lugol

Fórmula:

Iodeto de potássio (KI).....	2,0 g
Cristais de iodo.....	1,0 g
Água destilada.....	300,0 mL

Preparo:

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

A-2.1.3 Solução de safranina

Fórmula:

Safranina.....	2,5 g
Álcool etílico, 95%.....	100,0 mL

Preparo:

Dissolver 2,5 g de safranina em 100 mL de álcool etílico, 95% (solução-estoque de safranina). No momento do uso, diluir 10 mL da solução-estoque em 90 mL de água destilada.

A-2.1.4 Solução álcool-acetona

Misturar o álcool etílico, 95% e acetona em partes iguais.

A-2.2 Meio de Hugh & Leifson (OF) para os testes de fermentação da glicose e do manitol

Fórmula:

Triptona.....	2,00 g
Cloreto de sódio.....	5,00 g
Fosfato dibásico de potássio.....	0,30 g
Ágar.....	2,00 g
Azul de bromotimol.....	0,08 g
Água destilada.....	1,00 L
pH final após esterilização: 7,1	

Preparo:

Pesar 9,4 g do meio desidratado do "OF Basal Medium" e acrescentar 1000 mL de água destilada. Distribuir volumes de 100 mL em balões de 250 mL e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Após a autoclavagem para o teste de fermentação da glicose, adicionar asepticamente 10 mL de uma solução estéril a 10% de glicose, para cada 100 mL de "OF Basal Medium" e homogeneizar. Distribuir volumes de 5 mL em tubos de ensaio de 12 mm x 120 mm. Conservar os tubos em posição vertical, até que o meio se solidifique. Para o teste da fermentação do manitol, proceder da mesma maneira, adicionando asepticamente 10 mL de uma solução estéril a 10% de D-manitol, para cada 100 mL do meio de OF.

A-2.3 Ágar DNase com o indicador azul de o-toluidina para a pesquisa da desoxirribonuclease**Fórmula:**

Triptose.....	20,0 g
Cloreto de sódio.....	5,0 g
Ácido desoxirribonucleico.....	2,0 g
Ágar.....	15,0 g
Azul de o-toluidina.....	0,1 g
Água destilada.....	1000,0 mL
pH final após esterilização: 7,3 ± 0,1	

Preparo:

Pesar 42 g do meio desidratado "DNase Test Agar" e acrescentar 1000 mL de água destilada. Homogeneizar e adicionar 10 mL de uma solução a 10% de azul de o-toluidina (10 g de azul de o-toluidina em 100 mL de água destilada). Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Distribuir volumes de 20 mL do meio de cultura em placas de Petri estéreis e deixar solidificar. Armazenar as placas em temperatura de 2 a 8°C.

/ANEXO B

ANEXO B - RECOMENDAÇÕES DE ORDEM GERAL

B-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 ou 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 a avaliação e o controle dos meios de cultura a serem empregados no ensaio para determinação de *Staphylococcus aureus* 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 a distribuição dos poros, com a presença de áreas hidrofóbicas, com a toxicidade da 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 diâmetros irregulares determinam diferenças na velocidade de filtração em diferentes áreas da membrana. A membrana deve ser livre de áreas não porosas que impeçam a difusão de nutrientes para sua superfície 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 têm ação bactericida ou bacteriostática. Tais efeitos podem ser reconhecidos através da inibição do crescimento das colônias nas áreas adjacentes às linhas do quadriculado. Essas 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 forem empregadas. A impressão do quadriculado na superfície da membrana não deve ser muito forte, pois 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 apresentar áreas hidrofóbicas. 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 a sensibilidade do meio de cultura. Quanto ao tempo de armazenamento das membranas filtrantes, recomenda-se um período máximo de 12 meses, pois pode ocorrer alterações em suas características físicas com o decorrer do tempo, determinando perda da flexibilidade, havendo ruptura da membrana nos pontos de pressão criados durante a manipulação; além disto, durante a filtração, freqüentemente ocorre curvatura das bordas da membrana, impedindo o contato com o substrato.

B-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 quantidade de bactérias pela técnica de membrana filtrante. Em geral, as membranas filtrantes são embaladas individualmente ou acondicionadas em envelopes fechados contendo dez unidades pré-esterilizadas pelo fabricante, estando, portanto, prontas para uso. Quando isso não ocorre, a esterilização deve ser feita através de autoclavagem a 121°C, durante dez minutos; imediatamente após este período de tempo, deve-se efetuar a exaustão do vapor da autoclave e as membranas 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 área da membrana; além disso, as membranas podem tornar-se mais frágeis e quebradiças.

Comercialmente, a pré-esterilização das membranas filtrantes pode ser feita através da autoclavagem, por radiação gama ou por 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 este 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 autoclavagem a 121°C durante dez minutos, antes de sua utilização no laboratório.

B-6 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 a radiação ultravioleta.

B-7 Cuidados especiais com as membranas filtrantes

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

ANEXO C - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES**C-1 Lâmpadas germicidas ultravioleta (U.V.)****C-1.1 Características gerais**

São lâmpadas que emitem radiações ultravioleta com ação germicida. A luz ultravioleta inclui radiações entre 150 e 4000 Angstroms (Å), mas radiações inferiores a 1800 Å são absorvidas pelo oxigênio atmosférico, não tendo, portanto, aplicação para esterilização. O efeito mais potente para a morte de microrganismos ocorre a 2500 Å. As lâmpadas germicidas comerciais emitem primariamente 2537 Å, que tem 85% da capacidade germicida das radiações de 2600 Å.

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 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 seqüência de procedimento para sua exposição:

- 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 ao 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 dela forneça contagem de 200 a 250 microrganismos;

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

- c) para a realização do teste, pipetar 0.5 mL da diluição selecionada (contagem 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 ela o "Plate Count Agar", nas bordas da placa de Petri em que o meio está contido;

- após essa verificação, efetuar o espalhamento, posicionando a alça de Drigalski perpendicularmente à superfície do ágar, 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 inoculada sob a luz ultravioleta, 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 ultravioleta, é esperada uma redução mínima de 99% em relação à contagem obtida na placa-controle. Se essa redução for inferior a 80%, a lâmpada ultravioleta 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 esta finalidade, é a seguinte a seqüência de procedimentos recomendados:

C-2.1 Descontaminação

- a) com uma pinça, retirar a membrana e o meio de cultura contido na placa;
- b) acondicionar adequadamente esse material em saco plástico;
- c) embrulhar em papel Kraft;
- d) descontaminar em autoclave a 121°C, durante 30 minutos;
- e) após a retirada da membrana e do meio de cultura, imergir separadamente tampas e fundos das placas de Petri em recipientes contendo solução alcoólica de formol a 0,4% e deixar durante duas horas;
- f) após esse período, transferir tampas e fundos das placas de Petri para recipientes separados contendo solução de álcool etílico a 70%, e deixar em imersão durante duas horas.

Nota: Para placas de Petri em que não se observou nenhum crescimento de microrganismos, a etapa referente à imersão em solução alcoólica de formol pode ser suprimida.

C-2.2 Lavagem e secagem

- a) retirar tampas e fundos da solução de álcool etílico a 70% e colocá-los em solução de detergente a 3%, deixando em imersão durante o período de 12 a 24 horas (tempo requerido para facilitar a remoção de resíduos dos meios de cultura das placas):

- b) após o período requerido na solução de detergente, lavar cuidadosamente cada parte da placa, com auxílio de uma esponja;
- c) enxaguar dez vezes em água corrente, sempre esfregando com a mão as superfícies interna e externa das placas;
- d) efetuar uma enxaguadura final com água destilada ou desionizada e escorrer bem a água.

C-2.3 Desinfecção

- a) imergir as tampas e fundos das placas de Petri, separadamente, em solução de álcool etílico a 70%, durante duas horas;
- b) após esse período, retirar as tampas e fundos das placas de Petri e colocá-los sobre folhas de papel de filtro em local asséptico, para secagem à temperatura ambiente.

C-2.4 Esterilização

A esterilização pode ser realizada de duas maneiras, descritas a seguir:

- a) esterilização por exposição a radiação ultravioleta:
 - após a secagem, expor as paredes internas do fundo e da tampa das placas de Petri à ação direta de radiações ultravioleta, durante duas horas (ver Anexo C-1);
 - logo após a esterilização, fechar rapidamente, juntando a tampa e fundo sem tocar com a mão na superfície interna das placas;
 - acondicionar em caixas adequadas com tampa ou embrulhar com folhas de alumínio esterilizado; datar;
 - armazenar em local limpo e livre de poeira, durante, no máximo, duas semanas após a esterilização.
- b) esterilização por microondas:
 - após a secagem, juntar tampa e fundo e acondicionar as placas de Petri em caixas (com tampa) de material plástico resistente à temperatura do forno de microondas; colocar essas caixas fechadas no forno de microondas, evitando a sua sobrecarga;
 - a esterilização será realizada submetendo-se as placas de Petri de plástico a dois níveis de potência do forno de microondas:
 - . potência fraca: 2 minutos
 - . potência forte: 1 minuto
 - repetir essa operação três vezes consecutivas, deixando um intervalo adequado entre essas exposições (cerca de 20 minutos);
 - armazenar em local limpo e livre de poeira, durante, no máximo, duas semanas após a esterilização.

C-3 Limitações da técnica de membrana filtrante

C-3.1 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. Os principais fatores responsáveis por essas limitações são os indicados de C-3.1.1 a C-3.1.4.

C-3.1.1 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 apresentar-se 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 sabe-se que a população de *Staphylococcus* é alta, esse problema pode ser eliminado através da filtração de volumes pequenos da amostra.

C-3.1.2 Presença de metais pesados

Certas águas altamente poluídas com resíduos industriais podem conter mais que 1 mg/L de zinco ou cobre; os íons, que exercem uma ação microbiana, podem ser adsorvidos à membrana e, assim, impedir o crescimento de microrganismos, fazendo com que sejam obtidos resultados irregulares para o microrganismo pesquisado. Para amostras desse tipo, recomenda-se a adição de um agente quelante (EDTA) ao frasco antes de se efetuar a coleta da amostra.

C-3.1.3 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-3.1.4 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.

ANEXO D - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- D-1 ALICO, R.K. & DRACONJAC, M.F. Evaluation of culture media for recovery of *Staphylococcus aureus* from swimming pools. *Applied and Environmental Microbiology*, 51 (4): 699-702, 1986.
- D-2 BAIRD-PARKER, A.C. A classification of micrococci and staphylococci based on physiological and biochemical tests. *Journal General of Microbiology*, 30: 409-427, 1963.
- D-3 BLACK, A.P.; KEIRN, M.A.; SMITH, J.J.; DYKES, G.M.; HARLAN, W.E. The disinfection of swimming pool water - Part II. A field study of the disinfection of public swimming pools. *American Journal of Public Health*, 60: 740-750, 1970.
- D-4 CETESB. Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água. São Paulo, 1988, 150 p.
- D-5 CETESB. Avaliação de laboratórios de análises bacteriológicas de água. São Paulo, 1989 (Norma Técnica L5.010).
- D-6 CETESB. Controle de qualidade de meios de cultura. São Paulo, 1987 (Norma Técnica L5.216, 1ª rev.).
- D-7 CETESB. Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratório de microbiologia. São Paulo, 1986 (Norma Técnica M1.001, 1ª rev.).
- D-8 CETESB. Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos. São Paulo, 1985 (Norma Técnica L5.215, 1ª rev.).
- D-9 COSTA, A.L. & LEVY, C.E. Caracterização de *Staphylococcus aureus* e do *Staphylococcus epidermidis*: estudo comparativo entre os testes convencionais e o teste da termonuclease. *Revista de Microbiologia*, 20 (2): 157-164, 1989.
- D-10 COSTA, M.C.S.; CARVALHO, M.A.R.; CISALPINO, E.O.; DAMASCENO, C.A.V. Aspectos epidemiológicos de *Staphylococcus aureus* isolados no Hospital das Clínicas UFMA, III - Pesquisa de termonuclease. *Revista de Microbiologia*, 17 (3): 208-212, 1986.
- D-11 CRONE, P.B.; TEE, G.H. Staphylococci in swimming pool water. *Journal of Hygiene*, 73: 213-220, 1974.
- D-12 DIFCO LABORATORIES. Difco-manual-dehydrated cultura media and reagents for microbiology, 10 ed. Detroit, 1984, 1155 p.
- D-13 DUTKA, B.J. Some of the current developments in bacteriological indicator systems. Presented in: *International Seminar on Microbiological Indicators of Pollution and Health Hazards*, 1978, São Paulo, Brasil.
- D-14 EVANS, J.B. Coagulase positive staphylococci as indicators of potential health hazards from water. In: *Bacterial Indicators/Health Hazards Associated with Water*. American Society for Testing and Materials Special Technical Publication 635, Philadelphia, Pennsylvania, p. 126-130, 1977.
- D-15 FAVERO, M.S.; DRAKE, C.H.; RANDALL, G.B. Use of staphylococci as indicators of swimming pool pollution. *Public Health Reports*, 79: 61-70, 1964.

- D-16 FINEGOLD, S.M.; MARTIN, W.J.; SCOTT, E.G. Facultative staphylococci and micrococci. In: **Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology** 5th ed. The C.V. Mosby Company, Saint Louis, 1978.
- D-17 KEIRN, M.A.; PUTNAM, H.D. Resistance of Staphylococci halogens as related to a swimming pool environment. **Health Laboratory Science**, 5 (3): 180-193, 1968.
- D-18 KLAPES, N.A. Comparison of Vogel-Johnson and Baird-Parker media for membrane filtration recovery of staphylococci in swimming pool water. **Applied and Environmental Microbiology**, 46 (6): 1318-1322, 1983.
- D-19 KLOOS, W.E. & JORGENSEN, J.H. Staphylococci. In: E.H. Lennette, A. Balows, W.J. Hausler, Jr. and H.J. Shadomy (ed.), **Manual of clinical microbiology**, 1985, 4th ed. cap. 15, sec III, p. 143-153.
- D-20 KLOOS, W.E. & MUSSELWHITE, M.S. Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. **Applied Microbiology**, 30 (3): 381-395, 1975.
- D-21 KLOOS, W.E. & SCHLEIFER, K.H. Gram-positive cocci: Family I - *Micrococcaceae* - Genus IV - *Staphylococcus*. Rosenbach 1884, 15 AL (nom. cons. opin. 17th Jud. Comm. 1956, 153) IN: BUCHANAN, R.E. et alii. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore, Williams & Wilkings, 1986, V.2: sec. 12, p. 1013-1035.
- D-22 LECHEVALLIER, M.W.; SEIDLER, R.J. *Staphylococcus aureus* in rural drinking water. **Applied Environmental Microbiology**, 30 (4): 739-742, 1980.
- D-23 LACHICA, R.V.F.; GENIGEORGIS, C.; HOEPRICH, P.D. Metachromatic agar-diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. **Applied Microbiology**, 21 (4): 585-587, 1971.
- D-24 LIDWELL, O.M.; POLAKOFF, S.; JEVONS, M.P.; PARKER, M.T.; SHOOTER, R.A.; FRENCH, V.I.; DUNKERLEY, D.R. Staphylococcal infection in thoracic surgery: experience in a subdivided ward. **Journal Hyg. Camb.**, 64: 321-337, 1966.
- D-25 MORTON, E.H. & COHN, J. Coagulase and deoxyribonuclease activities of staphylococci isolated from clinical sources. **Applied Microbiology**, 23 (4): 725-733, 1972.
- D-26 PARISI, J.T. Coagulase-negative staphylococci and the epidemiological typing of *Staphylococcus epidermidis*. **Microbiological Reviews**, 49 (2): 126-139, 1985.
- D-27 RAYMAN, M.K.; PARK, C.E.; PHILPOTT, J.; TODD, E.C.D. Reassessment of the coagulase and thermostable nuclease tests as means of identifying *Staphylococcus aureus*. **Applied Microbiology**, 29 (4): 451-454, 1975.
- D-28 ROBINTON, E.D.; MOOD, E.W.; ELLIOT, L.R. A study of bacterial flora in swimming pool water treated with high-free residual chlorine. **American Journal of Public Health**, 47, 1101-1109, 1957.
- D-29 SPERBER, W.H.; TATINI, S.R. Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. **Applied Microbiology**, 29 (4): 502-505, 1975.

-
- D-30 TROUYEZ, G.; PELOUX, Y.; LEFORT, H. Problèmes pratiques posés par l'isolement e l'identification des staphylocoques au laboratoire. *Annales de L'Institut Pasteur de Lille*, 22: 397-412, 1971.
- D-31 ZIERDT, C.H.; GOLDE, D.W. Deoxyribonuclease positive. *Staphylococcus epidermidis* strains. *Applied Microbiology*, 20 (1): 54-57, 1970.
-