



# NORMA TÉCNICA

L5.216

Dez/1987  
35 PÁGINAS

Controle de qualidade de meios de cultura: 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	<b>CONTROLE DE QUALIDADE DE MEIOS DE CULTURA</b>  Método de ensaio	L5.216  DEZ/87
--------	--	----------------------

SUMÁRIO	Pág.
Introdução.....	1
1 Objetivo.....	2
2 Normas complementares.....	2
3 Definições.....	2
4 Aparelhagem.....	4
5 Procedimentos e requisitos necessários para a preparação de meios de cultura.....	8
6 Meios de cultura e reagentes.....	13
7 Avaliação de meios de cultura.....	16
Anexo A - Recomendações de ordem geral.....	33
Anexo B - Referências bibliográficas.....	35

### INTRODUÇÃO

A importância dos dados gerados em laboratórios de análises bacteriológicas de água impõe a necessidade de implantação de um programa de controle de qualidade analítica, dentro do qual os meios de cultura assumem uma importância particular para que dados confiáveis sejam obtidos.

A uniformidade na composição química de diferentes lotes do mesmo meio de cultura é um requisito fundamental em laboratórios nos quais são realizadas rotineiramente análises bacteriológicas de água, e isto tem determinado a utilização preferencial de meios de cultura desidratados, preparados comercialmente, em vez do seu preparo no laboratório a partir dos ingredientes básicos. No preparo dos meios de cultura desidratados, a pesagem única elimina a possibilidade de variações na composição química, as quais podem ocorrer quando os componentes do meio de cultura são pesados individualmente. Outro aspecto positivo relativo à utilização dos meios de cultura desidratados é a redução no tempo dispensado para o seu preparo.

Os meios de cultura desidratados devem ser submetidos pelo próprio fabricante a um adequado controle de qualidade e se os lotes em teste não atenderem às especificações quanto à sensibilidade, seletividade e diferenciação das colônias (quando pertinentes), não deverão ser liberados para o uso.

O controle de qualidade de meios de cultura pode, sem dúvida, representar uma parte substancial dos custos operacionais das indústrias

e as tentativas por parte destas para reduzir esse processo essencial conduzem a um controle de qualidade inadequado ou ineficaz e podem determinar um aumento do risco de que uma série de meios de cultura de qualidade inferior seja posta à venda. Portanto, é indispensável que os laboratórios de análises bacteriológicas de água, e fetuem um controle interno da qualidade de cada novo lote de meio de cultura adquirido, através da comparação de sua qualidade com a de outro lote que vem apresentando resultados satisfatórios no laboratório.

Além da realização destes testes para verificar a seletividade, sensibilidade e especificidade dos meios de cultura adquiridos, o programa de controle de sua qualidade deve incluir o estabelecimento de critérios básicos para seu preparo e a verificação de seu cumprimento pelos técnicos responsáveis e, em relação à aquisição de produtos químicos em geral, corantes e componentes de meios de cultura, seu grau de pureza e adequação ao uso em laboratórios de microbiologia devem constituir um critério fundamental a ser observado.

### 1 OBJETIVO

Esta Norma prescreve as técnicas utilizadas no controle de qualidade dos meios de cultura para sua avaliação quanto à sensibilidade, seletividade, especificidade e esterilidade. Prescreve, também, procedimentos fundamentais quanto ao preparo e utilização de produtos químicos, corantes e componentes dos meios de cultura.

### 2 NORMAS COMPLEMENTARES

Na aplicação desta Norma é necessário consultar:

- M1.001 - Lavagem, preparo e esterilização de materias em laboratórios de microbiologia;
- L5.215 - Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos.

### 3 DEFINIÇÕES

Para os efeitos desta Norma são adotadas as definições de 3.1 a 3.3.

#### 3.1 Técnica de tubos múltiplos

É utilizada para a determinação do NMP de bactérias em uma dada amostra. Esta técnica consiste na inoculação de volumes decrescentes da amostra (diluições decimais consecutivas) em um meio de cultura adequado, sendo que cada volume é inoculado em série de 5 tubos.

### 3.2 Técnica de membrana filtrante

Baseia-se na filtração de volumes adequados da amostra através de membrana filtrante com porosidade de 0,45  $\mu\text{m}$ . Após a filtração, a membrana é colocada sobre o meio de cultura adequado.

### 3.3 Contagem de bactérias heterotróficas em placas

A determinação da densidade de bactérias em uma amostra baseia-se no princípio de que, definindo condições de nutrição, temperatura e tempo de incubação, se houver bactérias viáveis na água, que possam se desenvolver nas condições estabelecidas, haverá formação de colônias que serão visualizadas após determinado período de incubação. Para isso, volumes decimais adequados da amostra são inoculados em placas de Petri, adicionando-se, a seguir, o meio de cultura apropriado.

## 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, (1,02 kg/cm<sup>2</sup>) produzindo, em seu interior, uma temperatura de 121,6°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°C em 30 minutos e mantenha essa temperatura durante o período de esterilização.

#### 4.1.3 Incubadora bacteriológica

Deve ser equipada com termostato e projetada de tal forma que a temperatura em todas as partes utilizadas seja  $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , com 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. A incubadora deverá manter 75 a 85% de umidade relativa e ser colocada em local onde a temperatura permaneça na faixa de 16 a  $27^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.1.4 Banho-maria

Equipado com termostato e/ou agitador de baixa velocidade, para esta bilização da temperatura de meios de cultura e incubação de amostras em alguns testes utilizados no controle de qualidade. A temperatura do banho-maria deverá ser ajustada de acordo com o teste a ser realizado e registros periódicos desta temperatura deverão ser efetuados, para assegurar que a mesma não ultrapasse o limite recomendado.

#### 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 pH = 4,0, pH = 7,0 e pH = 9 ou 10.

#### 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 latex 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).

#### 4.1.12 Frascos para água de diluição

De borossilicato (pyrex) ou vidro neutro, com tampas de rosca 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.

#### 4.1.13 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.

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

#### 4.1.15 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.

#### 4.1.16 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.

#### 4.1.17 Placas de Petri de plástico

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

#### 4.1.18 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).

#### 4.1.19 Membranas filtrantes estéreis

De 47 mm de diâmetro, com porosidade de 0,45 $\mu$ m, brancas, quadriculadas.

#### 4.1.20 Tubos de ensaio

Tubos de ensaio de borossilicato (pyrex) ou vidro neutro, com capacidade adequada para conter o volume necessário do meio de cultura e o inóculo da amostra. Usualmente são empregados tubos de ensaio de 18 mm x 180 mm, 16 mm x 150 mm, 12 mm x 120 mm e de 15 mm x 150 mm com tampa de rosca.

#### 4.1.21 Hastes de madeira

De aproximadamente 20 cm de comprimento e 0,2 cm de diâmetro. Após utilização as mesmas são autoclavadas a 121°C, durante 15 minutos e descartadas. Antes do uso, estas hastes são esterilizadas por calor seco (170-180°C, durante 3 horas).

#### 4.1.22 Porta-pipetas de aço inoxidável

#### 4.1.23 Caixas de aço inoxidável

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

#### 4.1.24 Pinças

De aço inoxidável com extremidades arredondadas.

#### 4.1.25 Estantes

Para tubos de ensaio de 18 mm x 180 mm e 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).

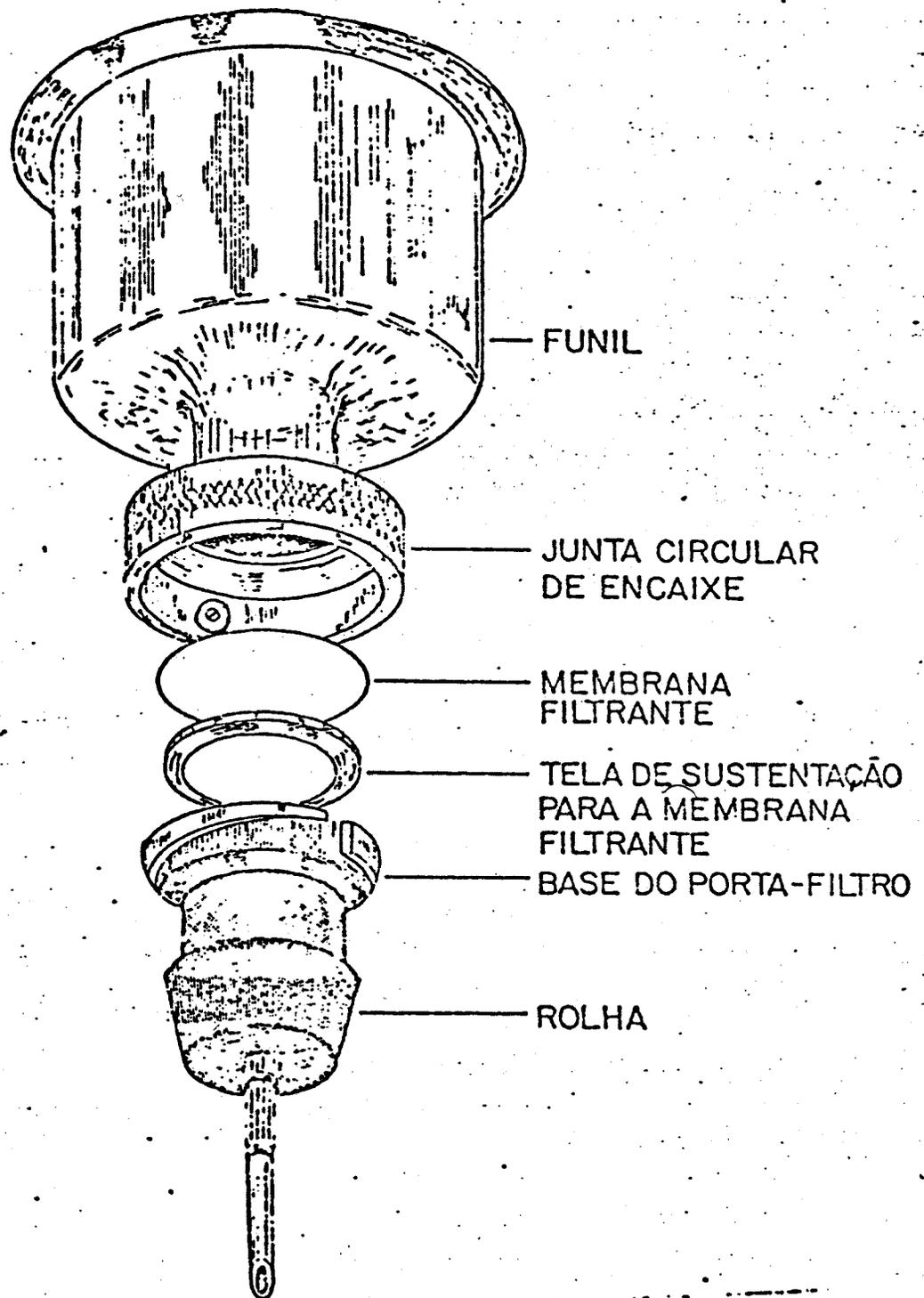


FIGURA 1 - Unidade de filtração (porta-filtro)

#### 4.1.26 Bico de Bunsen

#### 4.1.27 Tripé

#### 4.1.28 Tela de amianto

De tamanho 22 x 22 cm.

#### 4.1.29 Tubos de Durham

Devem ser de borossilicato (pyrex) ou vidro neutro, com diâmetro não inferior a 40% do diâmetro do tubo de ensaio em cujo interior serão utilizados. Usualmente são empregados tubos de Durham de 7 mm x 45 mm (para tubos de ensaio de 18 mm x 180 mm e 16 mm x 150 mm) e de 5 mm x 40 mm (para tubos de ensaio de 12 mm x 120 mm).

#### 4.1.30 Contador de colônias

Tipo Quebec ou similar, preferencialmente com campo escuro, ou outro modelo que forneça aumento equivalente (1,5 diâmetros) e possibilite visualização satisfatória das colônias a serem contadas, devendo a apresentar o campo quadriculado (quadrados de 1 cm<sup>2</sup>).

#### 4.1.31 Capela de segurança biológica (de fluxo laminar)

Equipada com filtro que possibilite a remoção de partículas presentes no ar e dirija o ar filtrado, de maneira laminar, diretamente sobre a área de trabalho.

Nota: Equipamento de uso opcional, podendo o teste ser realizado em ambiente que proporcione o grau de assepsia requerido.

#### 4.1.32 Bandejas de plástico ou de aço inoxidável

#### 4.1.33 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 vazamento.

### 5 PROCEDIMENTOS E REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A PREPARAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA

Os laboratórios de microbiologia devem estar capacitados para produzirem meios de cultura de qualidade satisfatória, assim sendo alguns procedimentos básicos são recomendados.

5.1 A preparação de meios de cultura nunca deve ser delegada a técnicos inexperientes. É importante que o pessoal envolvido nesta atividade esteja devidamente treinado sobre as técnicas de preparo, estocagem, controle de qualidade, manuseio de equipamentos e medidas de segurança.

5.2 Os reagentes utilizados no preparo de meios de cultura, devem ser de grau bacteriológico e de procedência idônea, apresentar odor, cor e consistência inalteradas, ser livres de elementos bactericidas ou bacteriostáticos bem como de carboidratos inespecíficos.

5.3 A aquisição de meios de cultura desidratados deve ser em quantidade suficiente para aproximadamente um ou dois anos de consumo. Os frascos de meios de cultura devem ser mantidos hermeticamente fechados em suas embalagens, em lugares frios, secos, de preferência livres de partículas de pó, contaminação e mudanças bruscas de temperatura. Em laboratórios não equipados com ar condicionado, o armazenamento dos meios desidratados deve ser efetuado colocando-se os frascos de boca para baixo; isto produz um efeito de selagem que retardará a decomposição do meio.

5.4 Manter um inventário dos meios de cultura relatando a marca, quantidade, aparência e número de unidades recebidas, bem como o número do lote e data de vencimento. Todos os frascos deverão ser datados quando adquiridos e quando abertos. Esse inventário deve ser verificado trimestralmente, e os meios de cultura que apresentarem mudanças de cor, endurecimento ou qualquer outra evidência de deterioração deverão ser descartados.

#### 5.5 Preparo e dissolução de meios de cultura

A dissolução inicial dos meios deve ser feita com água destilada fria, especialmente aqueles que contêm agar, uma vez que quando se utiliza água quente, forma-se imediatamente em torno de cada partícula de agar uma película que protege o núcleo. Ao ser aquecido, posteriormente, ocorre um aquecimento seco do núcleo que impede que a partícula seja completamente umedecida. Por este motivo, é aconselhável deixar os meios que contenham agar de molho em água destilada fria, pelo menos durante 15 minutos, agitando sempre a mistura e usando sempre, de preferência, recipientes de dimensões tais que facilitem a homogeneização. Como norma geral, o recipiente deve ter capacidade duas vezes maior que o volume de meio a ser preparado.

Os meios de cultura devem ser freqüentemente agitados e monitorados enquanto estão sendo aquecidos para evitar que entrem em ebulição. Para isso, pode-se utilizar um bico de Bunsen, um banho-maria ou uma placa aquecedora com agitador magnético.

Devem ser obedecidas as instruções do fabricante para cada meio em especial.

### 5.6 Distribuição dos meios de cultura

- a) a distribuição dos meios de cultura preparados deve ser efetuada em tubos ou frascos apropriados e em volumes recomendados de acordo com a técnica utilizada. Para evitar o desenvolvimento bacteriano neste material, o que pode alterar o pH e introduzir sub-produtos metabólicos tóxicos, o tempo total, desde a preparação até a esterilização não deve ser superior a duas horas;
- b) deve-se prestar particular atenção à distribuição de meios que irão receber amostras de água. Por exemplo, o caldo lactosado ou caldo lauril-triptose devem ser distribuídos em tubos sempre em quantidades iguais ou superiores a 10 mL, a fim de que a amostra a ser inoculada não altere significativamente a concentração do meio. Para inoculações de 1 mL ou menos, são utilizados tubos de caldo lactosado ou caldo lauril-triptose em concentração simples; para inoculações de 10 mL, são utilizados tubos com caldo de concentração dupla, em volumes iguais ou superiores a 10 mL.

### 5.7 Esterilização dos meios de cultura

Não deve haver excesso de aquecimento para evitar uma sobrecarga térmica que possa produzir hidrólise, peptonação, caramelização ou outro tipo de destruição das substâncias. Por exemplo, quando se aquece em demasia meios que contêm bile natural, os corantes biliares contidos na bile se transformam em produtos de oxidação, que dão uma cor amarelada. Ao mesmo tempo, as mucinas contidas na bile se precipitam como glicoproteídeos de cor branca.

Neste caso particular, estas modificações de cor não influem sobre a atividade dos meios de cultura que contêm bile, porém isto pode ser evitado com uma esterilização correta.

A esterilização de meios de cultura e de materiais pode ser efetuada da seguinte maneira:

- a) esterilização por autoclavação - devem ser seguidas as especificações do fabricante para a esterilização de meios específicos. O tempo de exposição requerido varia de acordo com o tipo de material, tipo de meio, presença de carboidratos e volume (ver Tabela 1).

Remover o meio esterilizado da autoclave, assim que a pressão da câmara chegar a zero. Nunca reautoclavar qualquer meio de cultura;

TABELA 1 - Tempo e temperatura de esterilização pelo processo de autoclavação

Materiais	Tempo a temperatura de 121°C
Membranas filtrantes e almofa das absorventes	10 minutos
Meios de cultura contendo carboidratos (Caldo Lauril Triptose, Caldo Verde Brilhante Bile, etc,)	12 a 15 minutos
Materiais contaminados, culturas para descarte	30 minutos
Água de diluição em frascos com tampa de rosca com volumes de 90 ± 2 mL	15 minutos
Água de diluição em balões com volumes de 500 a 1 000 mL	30 minutos

b) esterilização por filtração - meios de cultura e soluções não autoclaváveis, podem ser esterilizados por filtração, através de membrana filtrante com porosidade de 0,22 µm. A filtração deve ser feita em câmara de segurança biológica e a solução recolhida em vidraria estéril.

5.8 Os meios de cultura preparados (prontos para uso) devem ser guardados em uma área que ofereça proteção contra luz direta, contaminação externa e excessiva evaporação. É preferível o armazenamento em locais frios, já que o excesso de resfriamento nas geladeiras pode causar uma evaporação excessiva, se os meios forem guardados durante mais de uma semana. O armazenamento prolongado de meios estéril deve ser evitado.

Deve ser calculado um limite de produção de quantidade de meios de cultura, para que estes sejam utilizados dentro de uma semana.

Placas de Petri, contendo meios de cultura podem ser armazenados em sacos plásticos, os quais deverão ser adequadamente selados para evitar rápida desidratação.

#### 5.9 Controle do pH dos meios de cultura

A medida de pH dos meios de cultura deve ser feita com um potenciômetro, por ser o método mais exato. O controle de pH com papéis ou ti

ras indicadoras somente é aceitável para meios isentos de corantes e, mesmo neste caso, somente com a finalidade de orientação.

O potenciômetro deve ser calibrado pelo menos duas vezes ao dia com tampões de pH: 4,0, 7,0 e 9,0. Para meios de cultura líquidos, controla-se o pH, em geral, à temperatura de 25°C. Efetua-se a correção do pH antes da esterilização, utilizando-se pequenos volumes de uma solução de hidróxido de sódio 1N, para valores altos ou uma solução de ácido clorídrico 1N, para valores baixos. Geralmente, dependendo da autoclave, é normal que o pH do meio baixe 0,1 ou 0,2 unidades durante a esterilização, o que deve ser levado em consideração para se obter os valores finais de pH recomendados. Os meios que apresentarem, após a esterilização, um pH final que diferir em mais de 0,1 unidades do valor do pH, indicado na formulação, não devem ser utilizados.

#### 5.10 Produtos químicos em geral

Todos os produtos químicos utilizados na preparação dos meios de cultura devem ser de grau bacteriológico ou grau analítico. Isto é de particular importância para uma formulação correta dos meios, uma vez que algumas impurezas químicas, contidas nos reagentes comerciais ou de grau de pureza inferior podem ocorrer em concentrações suficientes para inibir o desenvolvimento das bactérias.

#### 5.11 Corantes

A atividade biológica dos corantes pode variar de lote para lote, e também de fabricante para fabricante. Portanto, recomenda-se que todos os corantes utilizados na preparação dos meios de cultura sejam adquiridos de lotes de grau bacteriológico certificados pela "Biological Stain Commission" dos (EEUU), ou outra entidade equivalente.

#### 5.12 Componentes dos meios

A maioria dos produtos comerciais dão resultados aceitáveis. Quando os meios são de origem desconhecida, os resultados obtidos devem ser comparados com aqueles resultados obtidos com a utilização dos produtos que apresentaram bons resultados. Em geral, dá-se preferência ao uso de meios desidratados, fabricados por fornecedores idôneos. Estes meios estão menos sujeitos a pequenas variações de composição química, por defeito de pesagem em seu preparo. Os meios desidratados são mais uniformes, pois estas variações são eliminadas.

5.13 A água destilada ou desionizada utilizada para o preparo de meios de cultura e soluções, deve ser de qualidade comprovada, livre de substâncias tóxicas ou nutritivas, que possam influenciar na so

brevivência e crescimento de microrganismos. É recomendável a avaliação periódica de sua qualidade, visando detectar qualquer contaminação ou problemas relativos às condições do destilador e do recipiente de armazenamento. (Ver Norma CETESB L5.215).

## 6 MEIOS DE CULTURA E REAGENTES

6.1 Para execução dos testes descritos no item 7 dessa Norma são os seguintes reagentes e meios de cultura necessários.

### 6.1.1 Reagentes

- agar;
- azul de metileno;
- cloreto de magnésio ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ) p.a.;
- cloreto de sódio (NaCl) p.a.;
- dextrose;
- fosfato dipotássico ( $K_2HPO_4$ ) p.a.;
- fosfato monopotássico ( $KH_2PO_4$ ) p.a.;
- hidróxido de sódio (NaOH) p.a.;
- infusão de coração bovino;
- peptona de soja;
- proteose peptona;
- tioglicolato de sódio; e
- triptona.

### 6.1.2 Meios de cultura

#### 6.1.2.1 Caldo de soja e triptona

##### Fórmula:

Triptona.....	17,0 g
Peptona de soja.....	3,0 g
Dextrose.....	2,5 g
Cloreto de sódio (NaCl) p.a.....	5,0 g
Fosfato dipotássico ( $K_2HPO_4$ ) p.a.....	2,5 g
Água destilada.....	1 000 mL
pH final após esterilização: $7,3 \pm 0,1$	

##### Preparo:

Para o preparo deste meio, pesar 30 g do meio desidratado "Tryptic Soy Broth" e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Deixar em repouso por 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 7,3.

Distribuição:

Este meio deve ser distribuído como segue:

Distribuição em tubos - distribuir com todos os cuidados de assepsia, volumes de aproximadamente 12 a 13 mL de caldo de soja e triptona em tubos de 15 mm x 150 mm, com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Após autoclavação, os tubos contendo o meio preparado podem ser armazenados a temperatura ambiente.

6.1.2.2 Meio de tioglicolato de Brewer (líquido)Fórmula:

Infusão de coração de boi.....	500,0 g
Cloreto de sódio (NaCl) p.a.....	5,0 g
Fosfato dipotássico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) p.a.....	2,0 g
Proteose peptona.....	10,0 g
Dextrose.....	5,0 g
Tioglicolato de sódio.....	0,5 g
Agar.....	0,5 g
Azul de metileno.....	0,002g
Água destilada.....	1 000 mL

pH final após esterilização: 7,2

Preparo:

Para o preparo desse meio, pesar 40,5 g do meio desidratado "Brewer Thioglycollate Medium" e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Deixar em repouso por 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 7,2.

Distribuição:

Este meio deve ser distribuído como segue:

Distribuição em tubos - distribuir, com todos os cuidados de assepsia, volumes de 12 a 13 mL do meio tioglicolato de Brewer em tubos de 15 mm x 150 mm, com tampa de rosca.

Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Após autoclavação os tubos contendo o meio preparado devem ser resfriados a 25°C e armazenados ao abrigo da luz e a temperatura ambiente.

Nota: Se o meio não for utilizado imediatamente após sua preparação e se em mais de 20% da parte superior de cada tubo ocorrer a mudança de coloração para verde, o mesmo não é adequado para o uso. Em tais circunstâncias é permitido apenas um reaquecimento do meio em banho-maria, para eliminar o oxigênio absorvido.

### 6.1.3 Soluções

#### 6.1.3.1 Água de diluição

##### Fórmula:

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

pH final após esterilização:  $7,2 \pm 0,1$

##### Preparo:

A água de diluição deve ser preparada como segue:

- preparar a solução estoque A com a seguinte composição:  
Fosfato monopotássico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) p.a..... 34,0 g  
Água destilada..... 1 000 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 1 N 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 à  $121^\circ\text{C}$ , durante 15 minutos. Rotular e armazenar em geladeira;
- 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 destilada..... 1 000 mL  
Para esse preparo, dissolver o cloreto de magnésio em 1 litro de água destilada. Distribuir volumes que sejam adequados à necessidade de uso do laboratório, em frascos com tampa de rosca. Rotular e armazenar em geladeira;
- adicionar 1,25 mL da solução estoque A e 5 mL da solução estoque B a 1 litro de água destilada;
- 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.

### 6.1.3.2 Solução normal de hidróxido de sódio (NaOH 1N)

#### Fórmula:

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

#### Preparo:

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

## 7 AVALIAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

### 7.1 Teste de avaliação de meios de cultura quanto à sensibilidade e seletividade

Específico para meios de cultura a serem utilizados na Técnica de Tubos Múltiplos.

#### 7.1.1 Princípio do método

Este método baseia-se na inoculação de alíquotas determinadas de uma amostra de água selecionada, em um conjunto de tubos de ensaio contendo o meio de cultura preparado a partir do lote a ser testado e outro conjunto contendo o mesmo tipo de meio de cultura, preparado a partir de um lote cujos resultados são conhecidos como satisfatórios (lote-controle). Para a inoculação em meios de cultura de concentração dupla, utilizam-se alíquotas de 10 mL da amostra de água e, para os de concentração simples, 1 mL.

#### 7.1.2 Amostras

Para a execução deste teste, utiliza-se amostra de água "in natura" ou amostra de água artificialmente contaminada, sendo que a densidade, em ambos os tipos de amostra, deve ser de 5 a 10 células viáveis por 100 mL.

Para a obtenção de uma água (artificialmente contaminada) que contenha 5 a 10 células viáveis, proceder de acordo com a técnica descrita na Norma L5.215, itens 5.2.1 a 5.2.1.8, utilizando-se a diluição adequada.

#### 7.1.3 Procedimento (ver Figura 2)

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

7.1.3.2 Para o teste de lotes de meios de cultura cuja utilização será feita no ensaio presuntivo na Técnica de Tubos Múltiplos, proceder da seguinte forma:

- a) preparar 25 tubos contendo 10 mL do meio de cultura preparado a partir do lote a ser testado e 15 tubos contendo

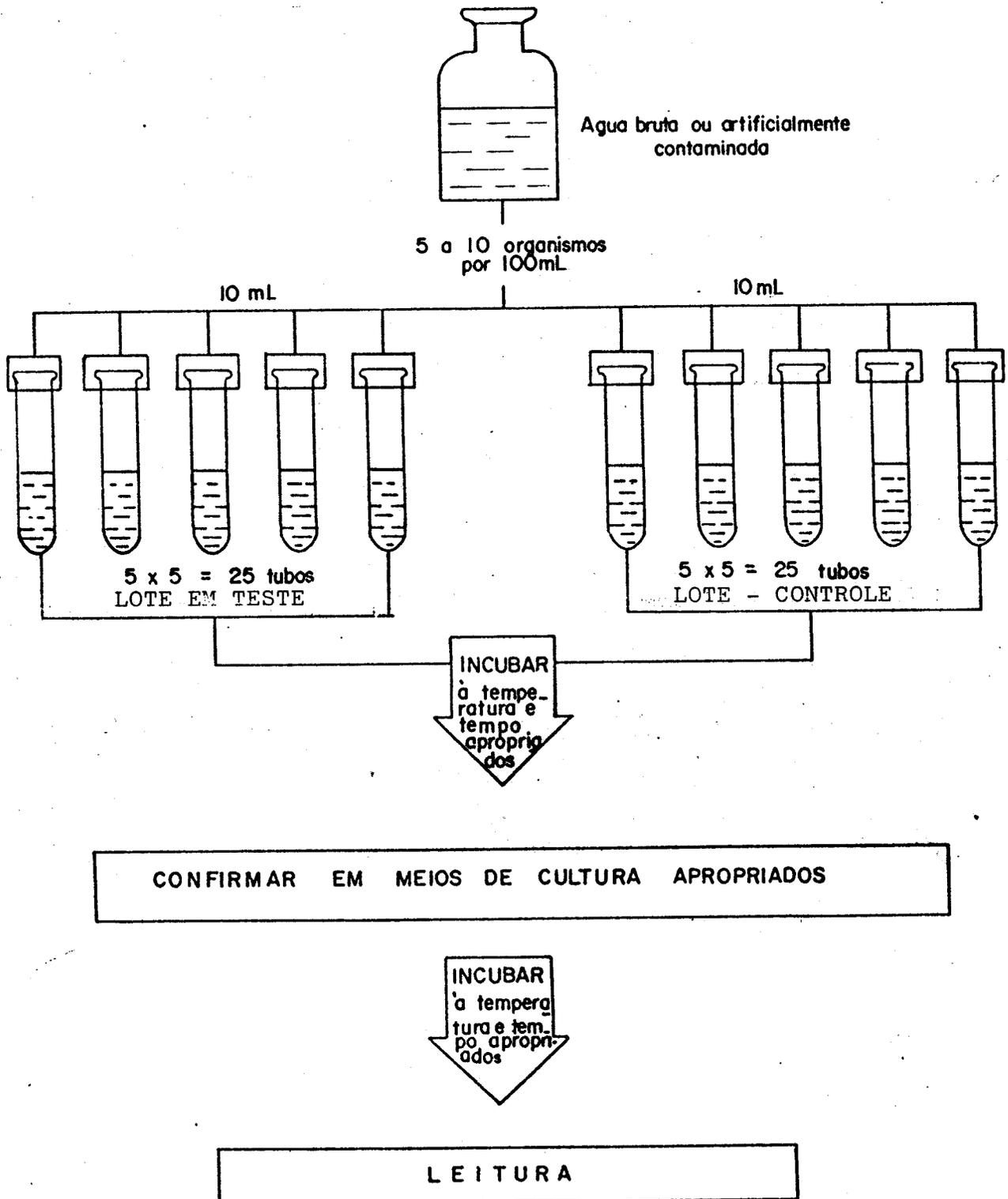


FIGURA 2 - Demonstração esquemática da seqüência do procedimento do teste de sensibilidade e seletividade - T.T.M.

- do 10 mL do mesmo meio de cultura preparado a partir de um lote cujos resultados são conhecidos como satisfatórios. Para o meio de concentração dupla, usar tubos de ensaio de 18 mm x 180 mm e, para o meio de concentração simples, usar tubos de ensaio de 16 mm x 150 mm;
- b) dispor cada conjunto de tubos em uma estante e proceder à sua identificação;
  - c) homogeneizar a amostra de água selecionada, no mínimo 25 vezes, inclinando o frasco, formando um ângulo de aproximadamente 45° entre o braço e o antebraço;
  - d) com uma pipeta estéril de 10 mL ou de 5 mL e obedecendo aos cuidados de assepsia, pipetar quantidades de 10 mL ou de 1 mL em cada um dos tubos de ensaio contendo o meio de cultura de concentração dupla ou simples, respectivamente;
  - e) levar à incubadora todos os tubos inoculados, sendo que a temperatura e o período de incubação devem ser adequados ao crescimento do microrganismo utilizado para a avaliação do meio de cultura;
  - f) após o período de incubação, efetuar a leitura dos resultados obtidos em cada conjunto de tubos;
  - g) anotar o número de tubos de cada conjunto nos quais as culturas apresentaram resultado positivo;
  - h) com alça de inoculação devidamente flambada e esfriada, transferir um inóculo de cada cultura com resultado presuntivo positivo para o tubo correspondente, contendo o meio confirmativo;
  - i) após a repicagem das culturas presuntivas positivas para o meio confirmativo, incubar os tubos inoculados à temperatura e períodos de tempo definidos em função do microrganismo utilizado para o teste; e
  - j) após o período determinado de incubação, efetuar a leitura e anotar os resultados.

Nota: A repicagem das culturas presuntivas positivas para o meio confirmativo correspondente requer a observação de detalhes que variam em função do microrganismo utilizado para o teste. Por exemplo, se o lote do meio confirmativo testado for o Caldo Azida-Etil-Violeta, a quantidade de inóculo deve ser correspondente a três transferências efetuadas com a alça de inoculação; se estiver sendo testado o Caldo Acetamida, para a confirmação

da presença de P. aeruginosa, o inóculo deve ser colhido na superfície do meio de cultura presuntivo correspondente, uma vez que seu metabolismo é essencialmente oxidativo, etc.

7.1.3.3 Para o teste de lotes de meio de cultura cuja utilização será feita no ensaio confirmativo na técnica de Tubos Múltiplos, proceder da seguinte forma:

- a) preparar dois conjuntos de 25 tubos presuntivos positivos, sendo que as culturas de um dos conjuntos (de 25 tubos) são confirmadas em meio de cultura cujos resultados são conhecidos como satisfatórios e as do outro conjunto, no meio confirmativo preparado a partir do lote em teste, procedendo a seguir, como no item 7.1.3.2 (h, i);
- b) após o período determinado de incubação, efetuar a leitura dos resultados obtidos em cada conjunto de tubos; e
- c) anotar o número de tubos de cada conjunto nos quais as culturas apresentaram resultado positivo.

#### 7.1.4 Resultados

Os resultados para o lote do meio de cultura em teste serão satisfatórios se o número de tubos com resultado positivo estiver na faixa de  $\pm 1$  tubo em relação ao resultado do lote de meio de cultura conhecido como satisfatório (controle).

#### 7.2 Teste de avaliação de meios de cultura quanto à sensibilidade e seletividade

Específico para meios de cultura destinados à utilização na Técnica de Membrana Filtrante.

##### 7.2.1 Princípio do método

Este teste baseia-se no exame de uma amostra de água selecionada contendo 5 a 10 células viáveis/100 mL, através da filtração de dois conjuntos de dez sub-amostras replicadas de 100 mL em membrana filtrante com porosidade de 0,45  $\mu\text{m}$ . Após a filtração, as membranas filtrantes são transferidas para placas de Petri de plástico, contendo o meio de cultura, sendo que, para um conjunto de sub-amostras, o meio de cultura é preparado a partir do lote em teste e, para o outro, a partir de um lote cujos resultados são conhecidos como satisfatórios (lote-controle). A avaliação do meio de cultura em teste é feita a partir da análise comparativa entre os resultados obtidos para cada conjunto de sub-amostras.

### 7.2.2 Amostra

Ver item 7.1.2.

### 7.2.3 Procedimento (ver Figura 3)

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

7.2.3.2 Dispor sobre a mesa de trabalho o seguinte material:

- a) conjunto de porta-filtros, previamente esterilizado;
- b) placas de Petri, contendo o meio de cultura preparado a partir do lote a ser testado e do lote conhecido como satisfatório;
- c) provetas graduadas estéreis, com a abertura recoberta com papel alumínio;
- d) pinça com as extremidades mergulhadas em álcool;
- e) membranas filtrantes estéreis de porosidade 0,45 µm; e
- f) bicos de Bunsen, para manter o ambiente asséptico e efetuar a flambagem das pinças utilizadas.

7.2.3.3 Preparação do porta filtro:

- a) 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; e
- b) acoplar a parte superior do porta-filtro à parte inferior, tendo cuidado para não danificar a membrana.

7.2.3.4 Preparo das sub-amostras para filtração:

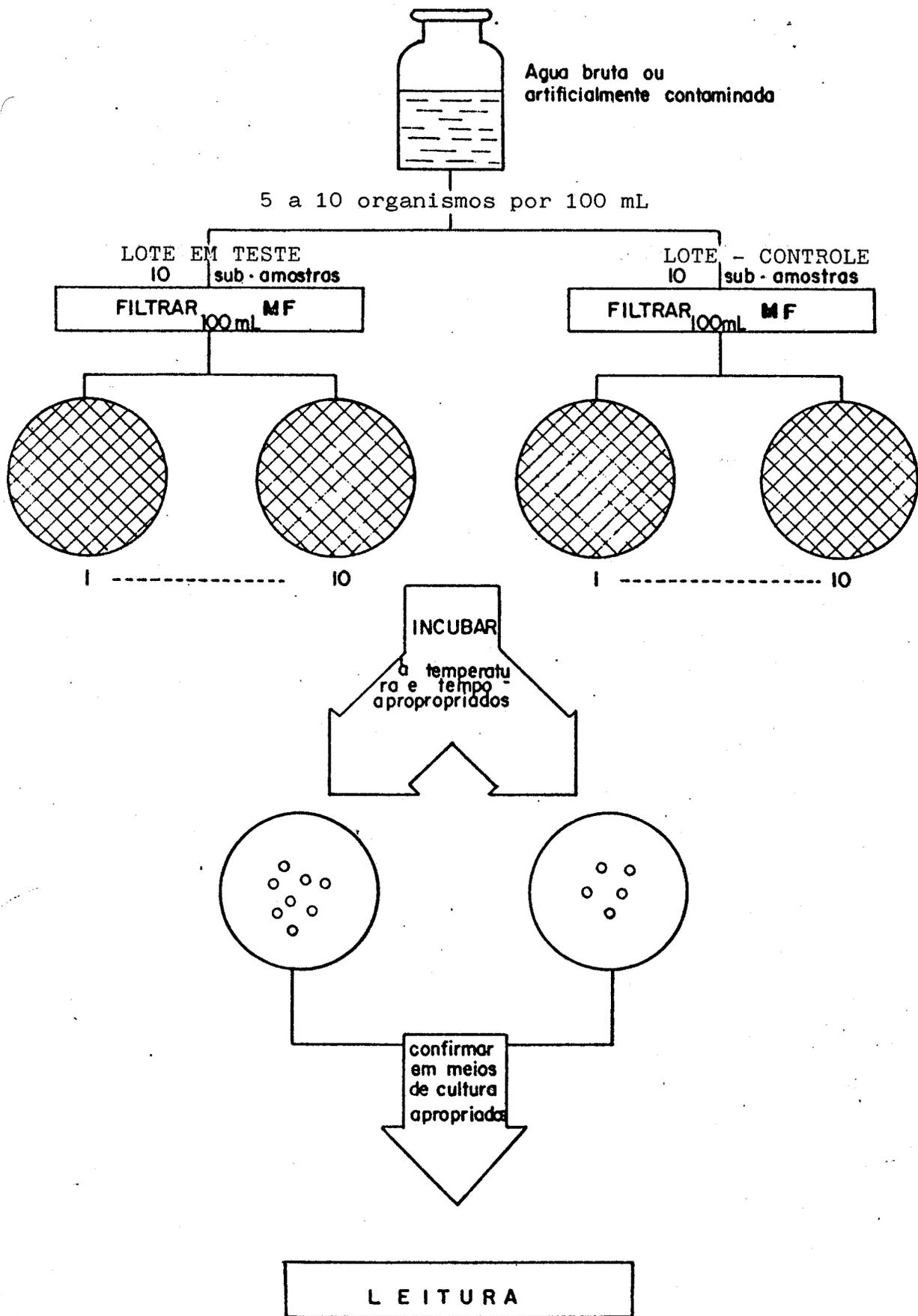
Homogeneizar vigorosamente a amostra de água selecionada e, com todos os cuidados de assepsia, transferir volumes de, no mínimo, 200 mL para 10 frascos, cujo volume seja suficiente para conter a sub-amostra e deixar um espaço que permita sua homogeneização.

7.2.3.5 Homogeneizar cada sub-amostra, no mínimo 25 vezes, inclinando o frasco, formando um ângulo de aproximadamente 45° entre o braço e o antebraço.

7.2.3.6 De cada sub-amostra, distribuir volumes de 100 mL em duas provetas previamente identificadas com o número correspondente e proceder à filtração.

7.2.3.7 Filtração dos volumes da sub-amostra:

- a) verter cuidadosamente no porta-filtro o volume da sub-amostra a ser examinado, evitando que a água respingue sobre as bordas superiores;



**FIGURA 3 - Demonstração esquemática da seqüência do procedimento teste de sensibilidade e seletividade - MF**

- b) ligar a bomba de vácuo e proceder à filtração;
- c) após a filtração, enxaguar o porta-filtro duas vezes com porções de 20-30 mL de água de diluição estéril, para evitar a retenção de alguma bactéria nas partes internas do mesmo;
- d) desligar a bomba de vácuo, ao finalizar a operação. Evitar secagem excessiva da membrana filtrante;
- e) em frente ao conjunto de filtração, colocar as placas de Petri, contendo o meio de cultura, sendo que para a filtração dos volumes de cada sub-amostra corresponda uma placa de Petri contendo o meio de cultura preparado a partir do lote em teste e outra contendo o mesmo meio preparado a partir do lote que vem apresentando resultados satisfatórios;
- f) separar a parte superior do porta-filtro e, com uma pinça cujas extremidades foram flambadas, retirar, com cuidado, a membrana. Acoplar novamente a parte superior do porta-filtro à inferior;
- g) obedecendo aos cuidados de assepsia, colocar cuidadosamente a membrana, com a superfície quadriculada voltada para cima, na placa de Petri que contém o meio de cultura correspondente;
- h) 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 (ver Figura 4); e
- i) lavar novamente o porta-filtro com água de diluição estéril e proceder à próxima filtração até que sejam filtradas as 10 sub-amostras em replicatas de 100 mL.

7.2.3.8 Incubar as placas com as membranas filtrantes, em posição invertida, à temperatura e por tempo apropriados para o crescimento do microrganismo utilizado para a avaliação do meio de cultura em teste.

7.2.3.9 Após o período de incubação e com auxílio de um microscópio estereoscópico com iluminação fluorescente perpendicular ao plano da membrana, efetuar a contagem das colônias típicas que se desenvolveram na superfície de cada membrana filtrante. Anotar os resultados.

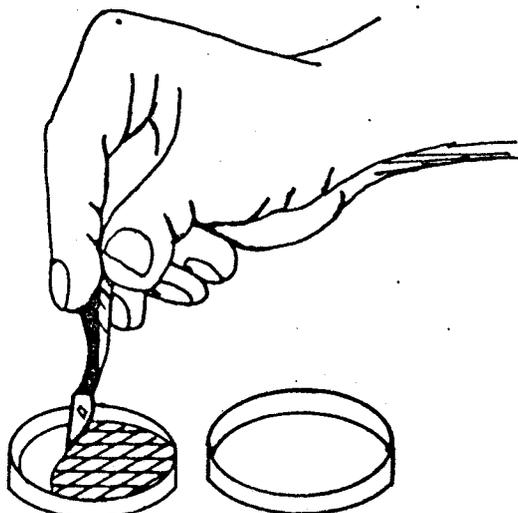


FIGURA 4 - Procedimento para retirada de bolhas de ar retidas entre a membrana filtrante e o meio de cultura

7.2.3.10 Efetuar a confirmação de todas as colônias típicas, utilizando meios de cultura adequados ao microrganismo utilizado para o teste.

7.2.3.11 Após a confirmação, somar o número total de colônias confirmadas obtidas nas 10 membranas de cada conjunto (correspondentes ao lote do meio de cultura em teste e ao lote controle) e anotar os resultados.

#### 7.2.4 Resultados

Os resultados para o lote de meio de cultura em teste são considerados satisfatórios se o número total de colônias confirmadas estiver na faixa de  $\pm 5$  em relação aos resultados obtidos com o lote de meio de cultura conhecido como satisfatório (controle).

Resultados insatisfatórios obtidos no meio em teste, quando comparados com o meio de referência, podem indicar contaminação da fórmula durante a fabricação do meio desidratado, presença de substâncias inibidoras não específicas à composição do meio, ou problemas ocorridos durante o seu preparo.

#### 7.3 Teste de avaliação de meios de cultura quanto à sensibilidade e seletividade

Específicos para os meios de cultura utilizados na Técnica de Contagem de Bactérias Heterotróficas em Placas.

### 7.3.1 Princípio do método

Este teste se baseia na inoculação de volumes determinados de uma amostra de água selecionada (que contenha 100 a 150 células viáveis/mL) em dois conjuntos de 20 placas, sendo que a um dos conjuntos a adiciona-se um volume estabelecido do meio de cultura preparado a partir do lote em teste e, ao outro conjunto, adiciona-se o mesmo meio de cultura preparado a partir de um lote cujos resultados são conhecidos como satisfatórios (lote-controle). A avaliação do lote de meio de cultura em teste é feita a partir da análise entre os resultados obtidos para cada conjunto de placas inoculadas.

### 7.3.2 Amostra

Para a execução deste teste, utiliza-se amostra de água de poço "in natura" ou amostra de água potável artificialmente contaminada, sendo que, em ambos os tipos de amostra, a densidade bacteriana deve ser de 100 a 150 células viáveis por mL.

### 7.3.3 Procedimento (vide Figura 5)

7.3.3.1 Antes de iniciar o exame, desinfetar a bancada do laboratório, usando um desinfetante que não deixe resíduos.

7.3.3.2 Preparar 40 placas de Petri e proceder à sua identificação, sendo que um primeiro conjunto de 20 placas será usado para o lote do meio de cultura em teste e o outro conjunto de 20 placas, para o lote do mesmo meio de cultura comprovado como satisfatório (lote-controle).

7.3.3.3 Homogeneizar a amostra de água selecionada, no mínimo 25 vezes, inclinando o frasco, formando um ângulo de aproximadamente 45° entre o braço e o antebraço.

7.3.3.4 Com uma pipeta estéril de 1 mL e obedecendo aos cuidados de assepsia, pipetar 1 mL da amostra em cada uma das placas de Petri dos dois conjuntos.

7.3.3.5 Após a inoculação, em um espaço de tempo inferior a 20 minutos, entreabrir as placas do primeiro conjunto e a cada uma delas acrescentar 12 a 15 mL do meio de cultura do lote a ser testado, previamente fundido e estabilizado em banho-maria a 44-46°C, tendo o cuidado de flambar a boca do tubo antes de verter o meio de cultura na placa.

7.3.3.6 Proceder como em 7.3.3.5 para o segundo conjunto de placas, acrescentando 12 a 15 mL do meio de cultura do lote conhecido como satisfatório.

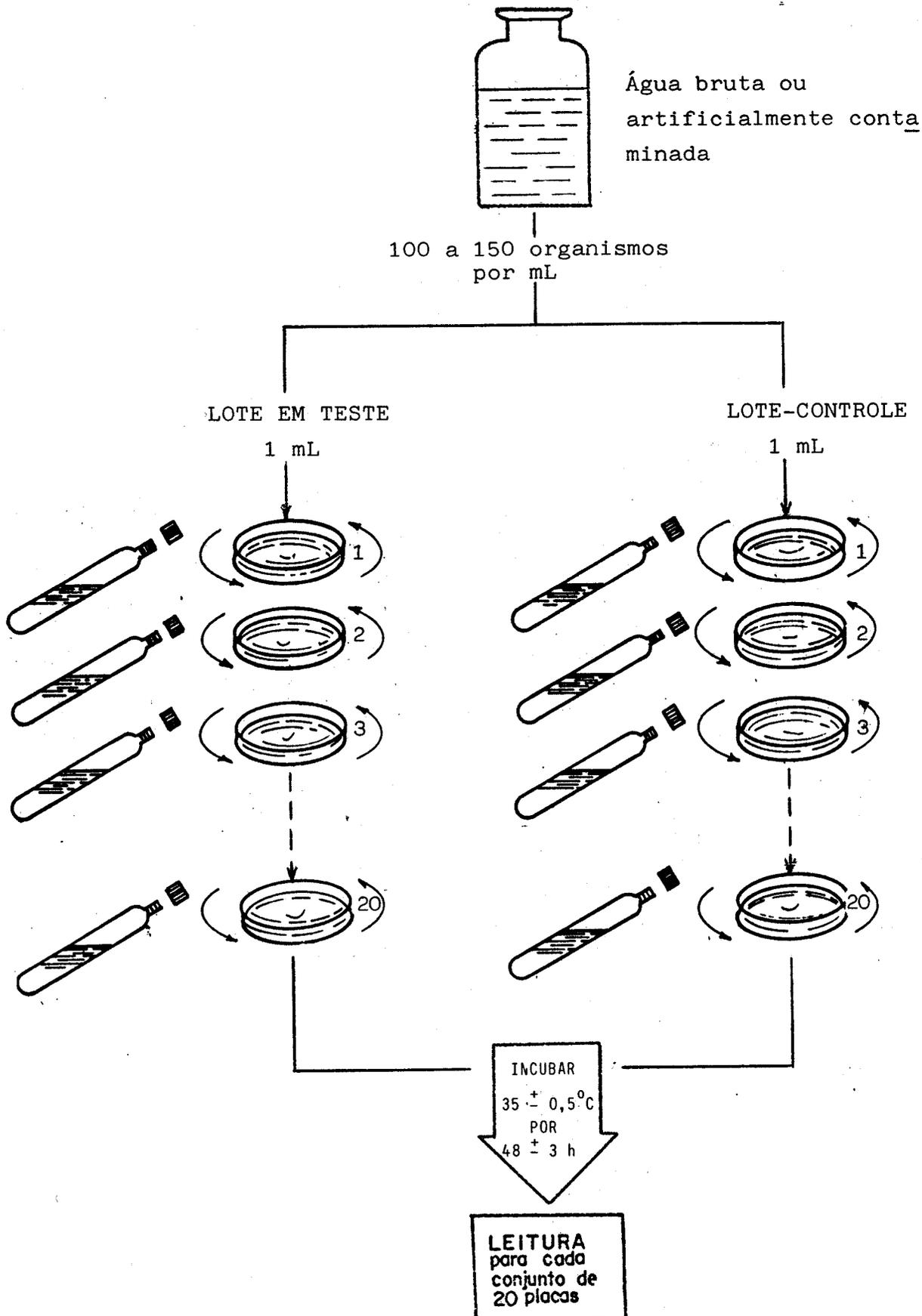


FIGURA 5 - Demonstração esquemática da seqüência do procedimento do teste de sensibilidade e seletividade - Bactérias heterotróficas em placas

7.3.3.7 Homogeneizar o inóculo e o agar contidos na placa com movimentos circulares em forma de um oito ( $\infty$ ), aproximadamente dez vezes consecutivas. Os movimentos devem ser moderados para não projetar o agar com o inóculo contra as paredes ou na tampa da placa.

7.3.3.8 Após a solidificação do agar, incubar as placas a  $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , durante  $48 \pm 3$  horas, se o meio em teste for o meio Agar Triptona Glicose Extrato de Levedura. As placas devem ser incubadas em posição invertida para evitar a condensação de água sobre a superfície do agar.

7.3.3.9 Após o período de incubação, com o auxílio de um contador de colônias Quebec ou similar, efetuar a leitura das placas e calcular a média geométrica das contagens correspondentes às 20 placas de cada conjunto.

#### 7.3.4 Resultados

Os resultados para o lote de meio de cultura em teste são considerados satisfatórios se a média geométrica das contagens relativas às 20 placas do conjunto em teste estiver na faixa de  $\pm 10\%$  em relação à média geométrica das contagens obtidas para o conjunto de placas correspondentes ao lote controle.

### 7.4 Teste de avaliação dos meios de cultura quanto à especificidade, utilizando-se culturas puras

#### 7.4.1 Princípio do método

Esta avaliação baseia-se na utilização de culturas puras de um microrganismo selecionado em função do meio de cultura a ser testado. Os resultados são considerados satisfatórios se o microrganismo utilizado para o teste apresentar crescimento característico no lote do meio de cultura em teste, quando comparado com seu crescimento no lote-controle.

#### 7.4.2 Procedimento

7.4.2.1 De cada 100 tubos de ensaio ou de cada 100 placas contendo o meio de cultura preparado a partir do lote a ser testado, separar um mínimo de 4 tubos ou 4 placas. Utilizar quantidade correspondente de tubos ou placas contendo o meio de cultura preparado a partir do lote cujos resultados são conhecidos como satisfatórios (lote-controle).

7.4.2.2 Preparar culturas puras, adequadas à finalidade do teste, selecionando o microrganismo em função do meio de cultura a ser testado.

7.4.2.3 Com uma alça de inoculação flambada e esfriada, transferir um inóculo da cultura do microrganismo selecionado para cada uma das placas ou tubos contendo o meio de cultura preparado a partir do lote a ser testado e para o conjunto de tubos ou placas correspondentes ao lote-controle. Para testar meios sólidos, distribuídos em placas de Petri, a transferência do inóculo deve ser efetuada como segue:

- a) depositar o inóculo em um ponto nas bordas da placa, girá-la e iniciar o espalhamento na superfície do primeiro quadrante, tomando cuidado para que a parte encurvada da alça toque apenas a superfície do meio, evitando ferir o agar (ver Figura 6);

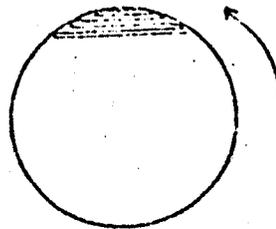


FIGURA 6

- b) girar novamente a placa e continuar o espalhamento no segundo quadrante (ver Figura 7); e

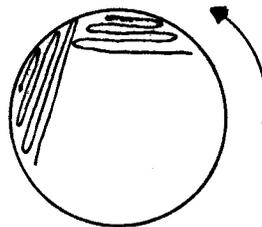


FIGURA 7

- c) proceder dessa maneira até completar a sementeira em toda a superfície do agar (ver Figura 8).



FIGURA 8

7.4.2.4 Incubar todos os tubos ou placas inoculadas, sendo que a temperatura e o tempo de incubação devem ser definidos em função do microrganismo selecionado, a cuja detecção o meio de cultura em teste se destina.

7.4.2.5 Após o período determinado de incubação, efetuar a leitura dos dois conjuntos de tubos ou placas. Considerar como resultado positivo os tubos ou placas onde houver o crescimento do microrganismo com as características esperadas, conforme a finalidade do teste e anotar os resultados.

#### 7.4.3 Resultados

Serão considerados satisfatórios os meios de cultura em teste que apresentarem crescimento bacteriano e reações específicas iguais às observadas no lote-controle. Quaisquer problemas evidenciados através deste teste impõem a necessidade de verificação da qualidade dos meios de cultura utilizados e se estão sendo seguidas as prescrições recomendadas para o seu preparo. Se o meio de cultura não for desidratado, deve-se averiguar a qualidade dos produtos químicos, corantes e componentes do meio de cultura.

### 7.5 Controle da ausência de contaminação dos meios de cultura preparados

#### 7.5.1 Princípio do método

Este teste consiste na incubação dos meios de cultura preparados no laboratório a temperaturas e durante o período de tempo determinados, com a finalidade de verificar sua esterilidade. Após o período de incubação, qualquer evidência de crescimento de microrganismos nos meios de cultura em teste indica sua contaminação, que pode ser decorrente de falhas no processo de esterilização ou contaminação após a esterilização.

#### 7.5.2 Procedimento

7.5.2.1 Após o preparo de cada meio de cultura e antes dos mesmos serem utilizados pelo laboratório, de cada 100 tubos de ensaio ou 100 placas contendo o meio preparado a ser testado, separar um mínimo de 4 tubos ou 4 placas de Petri.

7.5.2.2 Incubar os tubos ou placas contendo o meio de cultura em teste, à temperatura e durante um período de tempo adequados.

7.5.2.3 Após o período determinado de incubação, efetuar a leitura dos resultados, considerando qualquer evidência de crescimento de microrganismos no meio de cultura em teste como indicação de sua

contaminação.

### 7.5.3 Resultados

Os resultados são considerados satisfatórios para o meio de cultura em teste quando se verifica ausência de crescimento de microrganismos em todos os tubos ou placas incubadas. Se for verificada contaminação do meio, todo o lote de meio de cultura preparado correspondente a esse controle deve ser descartado, sendo necessária a análise dos fatores que possam tê-la determinado.

## 7.6 Teste de esterilidade de meios de cultura preparados no laboratório

### 7.6.1 Princípio do método

Este teste consiste na inoculação de volumes determinados de cada meio de cultura preparado no laboratório em meios de cultura adequados, com posterior incubação à temperatura e períodos determinados. Qualquer evidência da presença de microrganismos indica que o meio de cultura em teste não está estéril. Essa contaminação pode ser decorrente de falhas no processo de esterilização ou contaminação posterior.

### 7.6.2 Procedimento (vide Figura 9)

7.6.2.1 Selecionar 4 tubos de ensaio de cada 100 tubos preparados, contendo o meio de cultura a ser testado.

7.6.2.2 Com todos os cuidados de assepsia, transferir volumes adequados de cada um dos tubos, contendo o meio de cultura a ser testado, para cada tubo de ensaio, contendo Caldo de Soja e Triptona ou Meio de Tioglicolato de Brewer.

7.6.2.3 Incubar os tubos de ensaio a 35°C durante 48 horas a 14 dias.

7.6.2.4 Após o período de incubação, efetuar a leitura dos resultados em todos os tubos, considerando qualquer alteração observada no meio de cultura como indicação de crescimento de microrganismos.

### 7.6.3 Resultados

Qualquer evidência de crescimento observada no Caldo de Soja e Triptona ou Meio de Tioglicolato de Brewer indica que o meio de cultura não está estéril. Os meios de cultura em teste são considerados estéreis quando não se verifica crescimento nos tubos de Caldo de Soja e Triptona ou Meio de Tioglicolato de Brewer inoculados.

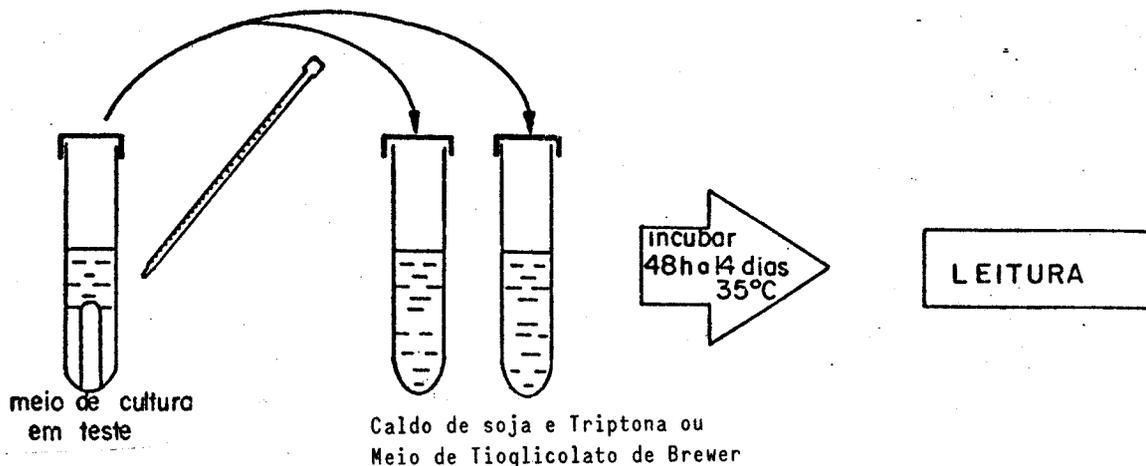


FIGURA 9 - Demonstração esquemática da seqüência do procedimento do teste de esterilidade

## 7.7 Prova de hidrólise da lactose

### 7.7.1 Princípio do método

Este teste baseia-se no princípio de que inoculando-se culturas de bactérias lactose-negativas selecionadas em meios de cultura em que a lactose é a única fonte de carbono, o crescimento destas bactérias indica a hidrólise deste açúcar. Para a seleção das culturas de bactérias lactose-negativas, deve-se considerar sua capacidade de metabolizar a D-glicose ou a D-galactose, que são produtos da hidrólise da lactose.

### 7.7.2 Procedimento (vide Figura 10)

7.7.2.1 Separar dois conjuntos de 4 tubos de ensaio de cada 100 tubos preparados, contendo o meio de cultura com lactose como única fonte de carbono e dispô-los em uma estante. Proceder à sua identificação.

7.7.2.2 Preparar culturas puras de bactérias previamente testadas quanto à sua capacidade de metabolizar lactose e culturas puras de bactérias, das quais testes anteriores comprovaram sua capacidade de metabolizar glicose e/ou galactose, mas não lactose.

7.7.2.3 Com uma alça de inoculação devidamente flambada e esfriada, transferir um inóculo da cultura de bactéria lactose-positiva para cada um dos 4 tubos do primeiro conjunto e um inóculo da cultura de bactéria lactose-negativa selecionada para cada um dos 4 tubos do outro conjunto.

7.7.2.4 Incubar todos os tubos inoculados à temperatura e durante um período de tempo determinados em função dos microrganismos selecionados para o teste.

7.7.2.5 Após o período de incubação, efetuar a leitura dos resultados obtidos nos dois conjuntos de tubos contendo o meio de cultura em teste. Considerar como resultado positivo, em ambos os conjuntos, a evidência de crescimento das bactérias inoculadas; sendo que a detecção visual desse crescimento dependerá do tipo de metabolismo que as bactérias inoculadas apresentam em relação à lactose.

### 7.7.3 Resultados

Os resultados são considerados satisfatórios para o meio de cultura em teste quando todos os tubos correspondentes à inoculação da cultura pura de bactérias lactose-positiva apresentam resultado positivo (crescimento) e não se verifica a ocorrência de crescimento em nenhum dos tubos correspondentes à inoculação das bactérias lactose-negativas.

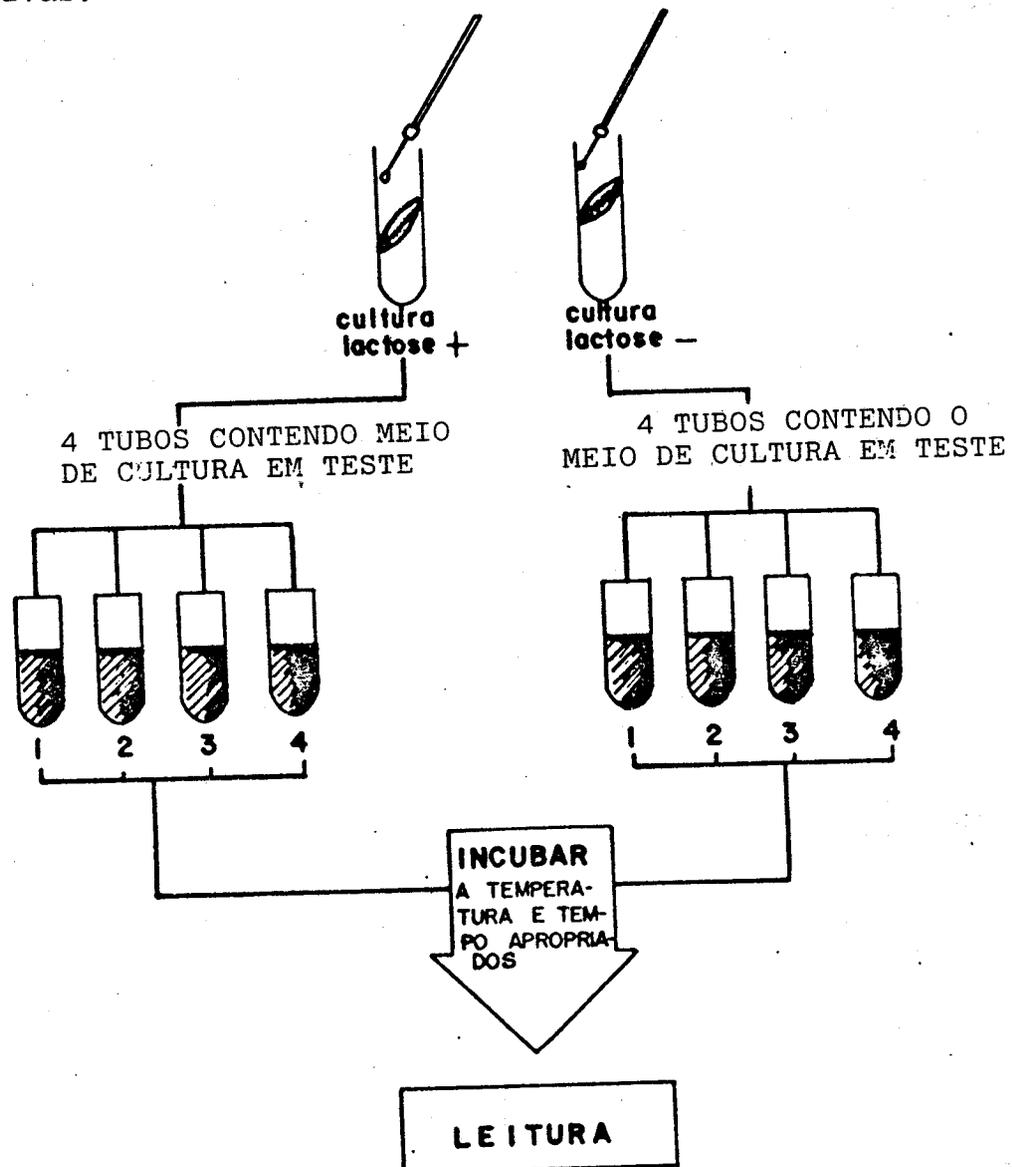


FIGURA 10 - Demonstração esquemática da seqüência do procedimento da prova de hidrólise da lactose



ANEXO A - RECOMENDAÇÕES DE ORDEM GERALA-1 Cuidados especiais com a vidraria

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

A-2 Controle da eficiência da autoclave

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

A-3 Local de trabalho

Alguns dos testes utilizados no controle de qualidade de meios de cultura devem ser efetuados, de preferência, em câmara asséptica ou em câmara de segurança biológica (câmaras de fluxo laminar).

A-3.1 As câmaras assépticas devem estar localizadas em áreas de movimento reduzido e ser livres de poeira; não deve haver movimentação excessiva do ar devido ao uso de ventiladores, exaustores, etc. Conversa desnecessária deve ser evitada.

A-3.1.1 Limpeza da câmara: é feita após o expediente diário, de preferência empregando solução de formalina ou outro desinfetante adequado. Chão, mesas e balcões são limpos diariamente. Nos fins de semana deve realizar-se uma limpeza mais rigorosa, inclusive do teto e das paredes. Após a limpeza, o ambiente deve ser impregnado com vapor de formol puro, sendo o formol colocado em placas de Petri, para evaporar.

A-3.1.2 Lâmpadas germicidas (U.V.): podem ser ligadas nos intervalos de trabalho e assim permanecer durante a noite. Convém lembrar que estas lâmpadas têm tempo de vida relativamente curto (cerca de 6000 horas para lâmpadas de 30 watts), que sua eficiência depende da distância existente entre elas e a área a ser esterilizada, que apresentam ação superficial apenas, e que poeira acumulada em sua superfície diminui o seu poder germicida.

A-3.1.3 Calor: aquecimento excessivo da câmara asséptica deve ser evitado pela ajuste da altura da chama do bico de Bunsen, através de seu dispositivo regulador ou pelo uso de uma pinça de Mohr na

ANEXO B - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- B-1 AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Microbiological examination of water. In: Standard methods for the examination of water and wastewater. 16 ed. Washington, APHA, AWWA, WPCF, 1985 . p. 827-1038.
- B-2 BLAZEVC, D.J.; HALL, C.T. & WILSON, M.E. Practical quality control procedures for the clinical microbiology laboratory. American Society for Microbiology. Cumitech 3, september , 1976.
- B-3 BORDNER, R. & WINTER, J. ed. Microbiological methods for monitoring the environment: water and wastes. U.S.Environmental Protection Agency, 1978. 308 p. (EPA-600/8-78-017).
- B-4 CETESB, São Paulo. Guia para avaliação de laboratórios bacteriológicos de análises de água. São Paulo, 1978, 81 p.
- B-5 \_\_\_\_\_, Avaliação de laboratórios de análises bacteriológicas de água. São Paulo, 1978 (Norma Técnica L5.010).
- B-6 \_\_\_\_\_, Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos. São Paulo, 1985 ( Norma Técnica L5.215).
- B-7 \_\_\_\_\_, Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratório de microbiologia. São Paulo, 1986 (Norma Técnica M1.001).
- B-8 DOUGLAS, G.W.; BALOWS, A.; RHODEN, D.; TOMFOHRDE, K. & SMITH, P. B. In use evaluation of commercially available set of quality control cultures. Applied Microbiology, 25: 230-234, 1973.
- B-9 GELDREICH, E.E. Handbook for evaluating water bacteriological laboratories. 2 ed. U.S.Environmental Protection Agency, 1975. 195 p. (EPA-670/9-75-006).

- B-10 GLASSER, L.; BOSLEY, G.S. & BOERING, J.R. A systematic program of quality control in clinical microbiology. American Journal of Clinical Pathology, 56: 379-383, 1971.
- B-11 NAGEL, J.G. & KUNZ, L.J. Needless retesting of quality assured commercially prepared culture media. Applied Microbiology, 26: 31-37, 1973.
- B-12 PRIER, J.E.; BARTOLA, J.T. & FRIEDMAN, H. Quality control in microbiology. University Park Press, 1975.
- B-13 RUSSEL, R.L.; YOSHIMORI, R.S.; RHODES, T.F.; REYNOLDS, J.W. & JENNINGS, E.R. A quality control program for clinical microbiology. American Journal of Clinical Pathology, 39: 489-494, 1969.
- B-14 TECHNICAL INFORMATION. Quality control of culture media. Detroit, Difco Laboratories, november, 1975.
- B-15 VERA, H.D. Quality control in diagnostic microbiology. Health Laboratory Science, 8: 176-189, 1971.
-