



NORMA TÉCNICA

L5.507

Fev/1992
55 PÁGINAS

Isolamento e identificação de vibrio cholerae em água e esgoto

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	VIBRIO CHOLERAE - ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO	L5.507
Método de ensaio		FEV/92

SUMÁRIO	Pág.
Introdução.....	1
1 Objetivo.....	3
2 Normas e documentos complementares.....	4
3 Definições.....	4
4 Aparelhagem.....	6
5 Reagentes e meios de cultura.....	10
6 Execução do ensaio.....	24
7 Resultados.....	46
Anexo A - Prescrições gerais.....	49
Anexo B - Referências bibliográficas.....	53

INTRODUÇÃO

A cólera é uma doença intestinal bacteriana aguda causada pelo Vibrio cholerae O1, biotipo clássico (cholerae), ou eltor, que geralmente ocorre em surtos explosivos; e caracteriza-se por diarreia aquosa abundante, vômitos ocasionais, rápida desidratação, acidoose, câibras musculares e colapso respiratório, podendo levar o paciente à morte num período de 4 a 48 horas (casos não tratados).

Os efeitos da cólera são devidos à ação de uma exotoxina (enterotoxina) produzida pelo V. cholerae, que atua nas células epiteliais da mucosa intestinal, fazendo com que ela se torne extremamente permeável, provocando perda de grande quantidade de líquidos e eletrólitos. Devido a grande perda de líquidos, o sangue torna-se viscoso, prejudicando o funcionamento de vários órgãos vitais.

A suscetibilidade e a imunidade à cólera são muito variáveis, sendo que a acloridria gástrica favorece a sobrevivência dos vibriões no estômago. Comumente afeta mais a população adulta e as crianças acima de 2 anos de idade.

As infecções assintomáticas e as formas benignas (diarreias discretas) são muito mais comuns do que os casos graves; esses casos são importantes para permanência do bacilo na comunidade e no meio ambiente.

A persistência da doença nas zonas endêmicas é facilitada pelos indivíduos infectados que eliminam o vibrião durante uma a duas semanas,

pela elevada proporção de infecções assintomáticas e curta imunidade pós-infecciosa, o que possibilita freqüentes reinfecções.

Durante séculos, a cólera se limitou, sob forma endêmica, à região dos rios Ganges e Brahmaputra, na Índia e Bengala. No período de 1817 a 1923, se deu a expansão dessa doença por quase todo o mundo, constando-se a ocorrência de seis pandemias distintas, envolvendo a Europa, Ásia, Norte da África e Américas.

A sétima pandemia de cólera, que se deve ao Vibrio cholerae, biotipo eltor, teve início em 1961 em Celebes, na Indonésia, tendo sido responsável por cerca de 1 200 000 casos durante o período de 1970 a 1989. Embora no decorrer da década de 80 o número de casos de cólera relatados tenha diminuído a cada ano, o número de países afetados triplicou. Em janeiro de 1991, a sétima pandemia chegou à América Latina, através de um surto epidêmico que está ocorrendo no Peru, causado pelo biotipo eltor sorotipo Inaba, tendo sido posteriormente relatados casos em vários países da América do Sul (Chile, Equador, Colômbia, Brasil, etc.), sendo a primeira vez neste século que a doença atinge o Brasil.

A propagação da doença nos vários países deve-se principalmente às características do biotipo eltor (que provoca muitos casos de infecções assintomáticas e leves), à falta de uma vacina eficaz, às facilidades e rapidez dos meios de transporte, ao turismo, ao fluxo migratório de áreas endêmicas, às más condições de saneamento e, principalmente, à falta de água potável.

A cólera é uma doença de transmissão hídrica e ocorre, primariamente, através de ingestão de água contaminada e, secundariamente, por alimentos contaminados com fezes ou vômitos de indivíduos infectados, por manipuladores assintomáticos de alimentos, pelo contato direto com fezes do doente, ou, ainda, por vetores (moscas e baratas).

Considerando-se que o principal meio de propagação da cólera é a água, em épocas de prováveis surgimentos de epidemias, o monitoramento e controle dos principais cursos d'água superficiais (rios, represas, lagos, etc.) e águas subterrâneas (poços, nascentes, etc.) devem ser aumentados e merecem cuidadosas investigações, visando sua proteção e adoção de medidas preventivas à propagação da doença. Portanto, deverá dar-se prioridade à aplicação dos princípios fundamentais de saneamento, relacionados com a disposição de fezes humanas e com a higiene e a qualidade dos alimentos, bem como garantir a água potável

para comunidade.

A sobrevivência do Vibrio cholerae no meio aquático é de grande importância epidemiológica, uma vez que a água constitui a principal fonte de disseminação da cólera e a possível manutenção deste agente etiológico no meio ambiente. A viabilidade do Vibrio no meio aquático é diretamente influenciada pelo pH, temperatura, luz solar, pressão osmótica, sais, matéria orgânica, microrganismos, onde a bactéria pode sobreviver durante vários dias ou semanas.

Estudos realizados pela CETESB, em convênio com a Organização Mundial de Saúde (OMS) em águas do Estado de São Paulo, demonstraram que a sobrevivência do V. cholerae em água do mar foi de 6 a 26 dias; em água doce de 6 a 19 dias e de 5 a 12 dias em água de esgoto. Constatou-se também nesse estudo que, em água contaminada, sua sobrevivência foi menor e as temperaturas de 10 e 25°C foram as mais favoráveis. Dependendo do tipo de água, seu período de sobrevivência pode ser aumentado, existindo dados na literatura internacional que citam até 60 dias.

O reservatório natural do V. cholerae 01 não é ainda bem conhecido. Embora tenha-se admitido que seja o homem, evidências recentes sugerem que o ambiente aquático possa ser o reservatório natural dessas bactérias, e estaria associado à presença de quitina nas carapaças de vários animais marinhos e plantas aquáticas.

Considerando-se o papel fundamental da água como fonte de disseminação do V. cholerae, a pesquisa dessa bactéria no meio aquático é de suma importância para localizar e acionar medidas de emergência para eliminar focos de contaminação e rastrear a origem da contaminação em regiões vulneráveis. Dessa forma, a presente Norma visa fornecer aos profissionais dos laboratórios de microbiologia ambiental a metodologia adequada para realizar o diagnóstico laboratorial de V. cholerae em amostras de águas.

1 OBJETIVO

Esta Norma prescreve o método qualitativo para a detecção do Vibrio cholerae em amostras de água e de esgoto, com a finalidade de:

- a) avaliar a qualidade de corpos d'água receptores de despejos industriais, domésticos e hospitalares;
- b) avaliar a eficiência dos processos de tratamento de esgoto e lixiviado de resíduos sólidos na remoção desse patógeno;
- c) avaliar possíveis fontes poluidoras e riscos de contaminação

- por V. cholerae no caso de águas utilizadas para fins recreacionais, inclusive águas marinhas;
- d) avaliar a qualidade das águas destinadas à irrigação de hortaliças e plantas frutíferas, à aquicultura de espécies destinadas à alimentação humana ou animal, à dessedentação de animais, etc.;
- e) localizar focos de contaminação de V. cholerae, especialmente em pontos críticos de entrada do agente, tais como em portos, aeroportos, estações ferroviárias e rodoviárias e outros;
- f) obter dados mais completos sobre determinadas fontes de poluição em áreas específicas para relacioná-los com os inquéritos epidemiológicos.

2 NORMAS E DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

Na aplicação desta Norma é necessário consultar:

- CETESB L5.215 - Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos.
- CETESB L5.516 - Controle de qualidade de meios de cultura.
- CETESB M1.001 - Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratório de microbiologia.
- CETESB - Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água.

3 DEFINIÇÕES

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

3.1 Cólera

Infecção intestinal aguda com período de incubação de um a quatro dias (48 horas em média), que se caracteriza por início abrupto, diarréia aquosa profusa de fezes riziformes (aspecto água de arroz), vômitos ocasionais, desidratação rápida, acidose e colapso circulatório. Muitos casos de cólera são leves e podem não se distinguir clinicamente de outros tipos de diarréia e são identificados somente através das coproculturas. Esses casos são epidemiologicamente importantes pela permanência do bacilo na comunidade e no meio ambiente.

3.2 Vibrio cholerae

Bacilos Gram-negativos, ligeiramente encurvados, com 0,5 a 0,8 µm de diâmetro por 1,4 a 2,6 µm de comprimento. Aeróbios ou anaeróbios facultativos, móveis por um flagelo polar, não produzem H₂S e são oxidase positivo. Fermentam glicose, sacarose, manitol e maltose sem produção de gás. Descarboxilam a lisina e ornitina e são arginina desidrolase negativa. Reduzem nitrato a nitrito, produzem gelatinase,

quitinase e indol, crescem a 40°C e toleram alcalinidade elevada (pH 9,2). Não utilizam inositol, salicina, D-sorbitol, L-alfa alanina, L-tirosina e putrescina, e são sensíveis ao agente vibrostático O/129. Não requerem o íon Na⁺ para crescimento, mas são capazes de crescer em concentrações de até 3% de cloreto de sódio. Segundo Smith (1979), o V. cholerae pode ser subdividido em 72 sorogrupos baseados nas características sorológicas do antígeno O, sendo o sorogrupo O1 o responsável pela cólera. O V. cholerae O1 inclui os sorotipos Ogawa, Inaba e Hikojima e pode ser dividido em biotipos clássico (ou cholerae) e eltor. A diferenciação dos biotipos é baseada nas provas de hemólise de eritrócitos de carneiro, hemaglutinação de eritrócitos de galinha, fermentação butileno glicólica (VP), sensibilidade à polimixina B (50U) e bacteriófagos específicos.

3.3 Bacilo

Designação dada às bactérias que apresentam forma cilíndrica ou de bastonetes.

3.4 Bactérias anaeróbicas facultativas

Bactérias que crescem tanto na presença de oxigênio como na sua ausência.

3.5 Portador

Portador de cólera é a pessoa que alberga ou elimina com as excretas o V. cholerae biotipo eltor, ou biotipo cholerae, mesmo sem manifestar sinais clínicos e sintomas da doença. Pode estar na fase pré-clínica da infecção, pode ser convalescente ou sadio. Atualmente, o portador é de grande importância na transmissão da cólera; pode-se considerar que ele é total ou parcialmente responsável pela disseminação da doença. Na verdade, as autoridades sanitárias podem precaver-se contra os problemas de entrada de indivíduos que estão realmente doentes ou de veículos contaminados, mas o simples portador dificilmente é detectado.

3.6 Epidemiologia

Epidemiologia é o estudo das condições de saúde e da ocorrência de doenças nas populações, visando à interceptação das causas que as determinam. De uma forma geral, é a ciência de como ocorre a enfermidade.

3.7 Endemia

Termo que expressa a existência de uma doença característica de certas regiões onde há uma incidência constante - ou incidência maior

em épocas determinadas - por influência de uma causa local própria dessas regiões. Em outras palavras, é a ocorrência habitual de uma doença ou de um agente infeccioso em determinada área geográfica.

3.8 Epidemia

Termo usado para definir a ocorrência de uma doença numa coletividade de em número de casos que ultrapassa a incidência esperada pelas variações casuais. Quando uma área geográfica é restringida e o número de pessoas é pequeno, o termo que se usa é surto.

3.9 Pandemia

Termo usado para definir uma epidemia que atinge grande número de pessoas em uma vasta área geográfica, podendo ultrapassar fronteiras continentais.

3.10 Veículo de transmissão

Meio pelo qual o agente infeccioso alcança o novo hospedeiro.

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 2µS/cm² a 25 °C e pH na faixa de 5,5 a 7,5.

1 As balanças devem ser colocadas em local adequado, protegidas de vibrações, umidade e mudanças bruscas de temperatura; 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 aço galvanizado.

3 A densidade de bactérias heterotróficas na água recém-destilada deve ser inferior a 1 000 unidades formadoras de colônias por ml (UFC/mL) e a 10 000 UFC/mL na água destilada armazenada, devendo esse controle ser efetuado com frequência mínima mensal (Norma CETESB L5.215).

4.1.4 Equipamentos para esterilização

4.1.4.1 Autoclave

É normalmente operada a uma pressão de 103 393 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 minutos⁴.

4.1.4.2 Estufa de esterilização

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

4.1.5 Equipamento para concentração em membrana filtrante

4.1.5.1 Vasilhame de pressão

De aço inoxidável, com capacidade para 5 a 10 litros.

4.1.5.2 Porta-filtro

De aço inoxidável, com 142 mm ou 293 mm de diâmetro.

4.1.5.3 Mangueiras de borracha

Com parede espessa e resistentes à pressão.

4.1.5.4 Fonte de vácuo e pressão

Bomba de vácuo e pressão, ou outro dispositivo conveniente para produzir uma pressão de 147,1 kPa.

4.1.6 Incubadora bacteriológica termostaticada

Deve manter a temperatura na faixa de 35 ± 0,5 °C e a umidade relativa entre 75 e 85%⁵.

4.1.7 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 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 materiais a serem esterilizados. Estas ampolas depois da autoclavação 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, significa que a esterilização foi insuficiente, pois houve desenvolvimento de bactérias.

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 parte central da mesma. A estratificação da temperatura na incubadora pode ser evitada através da colocação, em seu interior, de um dispositivo para circulação do ar.

4.1.8 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 coleta de amostras

De vidro neutro ou plástico autoclavável atóxico, com capacidade mínima de 5 litros, boca larga e tampa à prova de vazamento.

4.2.3 Frascos de Erlenmeyer

De borossilicato ("pyrex") ou de vidro neutro, com capacidade de 125 mL.

4.2.4 Frascos para solução fisiológica

De borossilicato ("pyrex") ou de vidro neutro, com tampas de rosca que permitam boa vedação e sejam livres de substâncias tóxicas solúveis.

4.2.5 Pipetas

De borossilicato, tipo Mohr, para 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 Pipetas Pasteur

4.2.7 Placas de petri de vidro

Devem ser de borossilicato ("pyrex") ou de vidro neutro de boa qualidade, com 100 mm de diâmetro e 15 mm de altura.

4.2.8 Tubos de ensaio

De borossilicato ou de vidro neutro, com capacidade para conter o meio de cultura e o inóculo da amostra.

Nota: Usualmente são empregados tubos de ensaio de 8 x 180 mm, de 16 x 150 mm e de 12 x 120 mm.

4.3 Outros materiais

4.3.1 Alças de inoculação

Fio de níquel-cromo, platina-irídio ou platina, com 0,5 mm de diâmetro e 70 a 80 mm de comprimento, com uma alça de 3 mm de diâmetro na extremidade, 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 Fio de náilon ou arame

Para fixação de mecha de gaze no local da amostragem.

4.3.8 Luvas cirúrgicas ou descartáveis

4.3.9 Máscaras cirúrgicas assépticas

4.3.10 Membranas de éster de celulose

Mistura de nitrato e acetato de celulose, com porosidade de 0,22 e 0,45 μm (previamente esterilizadas ou autoclaváveis). Deverão ser de boa qualidade, apresentar retenção total de bactérias e velocidade de filtração satisfatória.

4.3.11 Rolo de gaze ou atadura de crepe (hospitalar)

Deve ter aproximadamente 230 mm de largura.

4.3.12 Saco plástico

Deve ser de plástico transparente, grosso e resistente, com capacidade de 20 litros (usado na coleta das amostras através da mecha de gaze).

4.3.13 Saco plástico autoclavável

Com capacidade de 20 litros.

4.3.14 Papel alumínio

4.3.15 Papel Kraft

4.3.16 Pinças

De aço inoxidável, com extremidades arredondadas.

4.3.17 Pipetador de segurança ou pera de sucção4.3.18 Tela de amianto4.3.19 Termômetros4.3.20 Tesoura

De aço inoxidável, com ponta fina.

4.3.21 Tripé5 REAGENTES E MEIOS DE CULTURA

5.1 Para a preparação dos meios de cultura e soluções utilizadas neste ensaio são necessários:

5.1.1 Reagentes:

- Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA);
- Ácido ortofosfórico p.a.;
- Ágar;
- Água destilada;
- Álcool etílico absoluto;
- Alfa-naftol;
- Amido;
- Arabinose;
- Azul de bromotimol;
- Azul de timol;
- Bile de boi desidratada;
- Caldo nutriente nº 2 (Oxoid);
- Cera de carnaúba em pedaços;
- Citrato férrico;
- Citrato de ferro amoniacal (verde);
- Citrato de sódio p.a.;
- Cloreto de cálcio p.a.;
- Cloreto de sódio p.a.;
- Cloridrato de N, N, N', N'-tetrametil-p-fenilenodiamina p.a.;
- Desoxicolato de sódio p.a.;
- 2,4 diamino-6,7-fosfato de diisopropil pteridina (O/129);
- Extrato de carne;
- Extrato de levedura;
- Fosfato de potássio dibásico anidro p.a.;
- Fosfato de sódio dibásico anidro p.a.;
- Fosfato de sódio dibásico pentaidratado p.a.;
- Glicose (dextrose);

- Hidrolisado de caseína;
- Hidróxido de potássio p.a.;
- Hidróxido de sódio p.a.;
- Hipoclorito de sódio;
- Inositol p.a.;
- L-arginina;
- L-lisina;
- L-ornitina;
- L-triptofano;
- Lactose p.a.;
- Manitol p.a.;
- Manose p.a.;
- Nitrato de potássio p.a.;
- P-dimetilamino benzaldeído p.a.;
- Peptona;
- Piridoxal;
- Polimixina B;
- Proteose peptona;
- Púrpura de bromocresol;
- Sacarose p.a.;
- Sulfato ferroso;
- Sulfato de polixima;
- Telurito de potássio p.a.;
- Tioglicolato de sódio;
- Tiosulfato de sódio anidro;
- Triptona;
- Uréia p.a.;
- Vaselina líquida;
- Vermelho de cresol;
- Vermelho de fenol;

5.1.2 Meios de cultura desidratados⁶

- Ágar Kligler com ferro ("Kligler Iron Agar");
- Ágar TCBS ("TCBS Agar");

⁶ Para o preparo dos meios de cultura, dá-se preferência à utilização de meios de cultura desidratados, de procedência idônea, visando maior uniformidade dos mesmos. Pode-se, no entanto, prepará-los no laboratório, sendo que os reagentes a serem utilizados devem ser de grau bacteriológico e de procedência idônea, apresentar cor, odor e consistência inalterados, ser livres de elementos bactericidas ou bacteriostáticos inespecíficos e outros carboidratos fermentáveis que não os em teste, e fornecer os nutrientes necessários para os organismos pesquisados. Os frascos de meios de cultura desidratados devem ser mantidos hermeticamente fechados e suas embalagens guardadas em local fresco e seco, protegidos da luz.

- Base de Moeller para descarboxilase ("Decarboxylase Base Moeller");
- Meio basal para oxidação e fermentação ("OF Basal Medium");
- Meio para prova de Voges-Proskauer ("MR-VP Medium");
- Meio de transporte Cary e Blair ("Cary and Blair Transport Medium");
- Meio de Mueller Hinton ("Mueller Hinton Medium").

5.1.3 Soros

- Antisoro polivalente para V. cholerae 01;
- Antisoro V. cholerae Ogawa;
- Antisoro V. cholerae Inaba.

5.2 Preparo dos meios de cultura

5.2.1 Meio de transporte Cary e Blair

Fórmula

Tioglicolato de sódio.....	1,5 g
Fosfato de sódio dibásico anidro.....	1,1 g
Cloreto de sódio.....	5,0 g
Ágar.....	5,0 g
Água destilada.....	991,0 mL
pH final após esterilização: 8,4 ± 0,2	

Preparo:

Pesar 12,6 g do meio desidratado "Cary and Blair Transport Medium" e acrescentar 991 mL de água destilada fria. Deixar em repouso durante aproximadamente, 15 minutos. Aquecer, agitando freqüentemente até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Estabilizar em banho-maria a 50°C. Adicionar assepticamente 9 mL de uma solução aquosa a 1% de cloreto de cálcio. Homogeneizar e esterilizar o meio em vapor fluente durante 15 minutos em banho-maria. Distribuir, com todos os cuidados de assepsia, volumes de 300 mL em sacos plásticos de 20 litros. Fechar e estocar a temperatura de 2 a 8°C.

5.2.2 Água peptonada alcalina (concentração simples)

Fórmula:

Peptona.....	10,0 g
Cloreto de sódio.....	10,0 g
Água destilada.....	1 000,0 mL
pH final: 8,8 ± 0,2 a 25°C	

Preparo:

Pesar a peptona e o cloreto de sódio e acrescentar 1 000 mL de água destilada. Aquecer, agitando freqüentemente até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir volumes de 10 mL em tubos de ensaio de 16 x 150 mm. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.⁷

5.2.3 Água peptonada alcalina (concentração dupla)Fórmula:

Peptona.....	20,0 g
Cloreto de sódio.....	20,0 g
Água destilada.....	1 000 mL
pH final: 8,8 ± 0,2 a 25°C	

Preparo:

Pesar a peptona e o cloreto de sódio e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Aquecer, agitando freqüentemente até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir volumes de 10 mL em tubos de ensaio de 18 x 180 mm. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Na hora do uso, com todos os cuidados de assepsia, colocar o conteúdo de cada tubo (10 mL) em erlenmeyers estéreis de 125 mL.

5.2.4 Ágar TCBS (Ágar tiosulfato, citrato, sais biliares e sacarose)Fórmula:

Extrato de levedura.....	5,0 g
Proteose peptona.....	10,0 g
Citrato de sódio.....	10,0 g
Tiosulfato de sódio anidro.....	10,0 g
Bile de boi desidratada.....	8,0 g
Sacarose.....	20,0 g
Cloreto de sódio.....	10,0 g
Citrato férrico.....	1,0 g
Azul de bromotimol.....	0,04 g
Azul de timol.....	0,04 g
Ágar.....	15,0 g
Água destilada.....	1 000,0 mL
pH final: 8,6 ± 0,2 a 25°C	

NÃO AUTOCLAVAR

⁷ A esterilização de soluções ou de meios de cultura em autoclave deve ser feita em temperatura de 121°C durante 15 minutos. Durante a autoclavação de 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 que constituem os meios de cultura.

Preparo:

Pesar 89,0 g do meio desidratado "TCBS Agar" e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria, deixando em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer, agitando freqüentemente até a completa fusão do ágar, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir volumes de 12 a 15 mL em placas de Petri de 15 x 120 mm, previamente esterilizadas. As placas contendo o meio de ágar TCBS devem ser armazenadas sob refrigeração.

5.2.5 Ágar Kligler com ferroFórmula:

Extrato de carne.....	3,0 g
Extrato de levedura.....	3,0 g
Peptona.....	15,0 g
Proteose peptona.....	5,0 g
Lactose.....	10,0 g
Glicose.....	1,0 g
Sulfato ferroso.....	0,2 g
Cloreto de sódio.....	5,0 g
Tiosulfato de sódio anidro.....	0,3 g
Vermelho de fenol.....	0,024 g
Ágar.....	12,0 g
Água destilada.....	1 000,0 mL
pH final: 7,4 ± 0,2	

Preparo:

Pesar 55,0 g do meio desidratado "Kligler Iron Agar" e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria, deixando em repouso por aproximadamente 15 minutos. Aquecer, agitando freqüentemente até a completa fusão do ágar, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir volumes de 6 a 7 mL em tubos de ensaio de 12 x 120 mm. Tamponar com algodão hidrófilo e esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Após esterilização e enquanto o meio estiver quente, impregnar o tampão com reativo para indol (ver 5.3.1). Deixar esfriar, inclinando de tal maneira que a base seja aproximadamente 1/3 da altura do ápice. Armazenar sob refrigeração.

5.2.6 Meio de Rugai e lisina-motilidade (IAL), segundo Pessoa & Silva

O meio de cultura completo é constituído de quatro fases:

- a) interfase (vascar: vaselina-carnaúba);
- b) fase inferior (meio para testes de descarboxilação da lisina e de motilidade;

- c) fase superior (meio de Rugai & Araújo);
d) tampão (com reativo para indol).

5.2.6.1 Interfase (vascar: vaselina-carnaúba)

Fórmula:

Vaselina líquida.....	90,0 mL
Cera de carnaúba.....	18,0 g

Preparo:

Pesar 18 g da cera de carnaúba e acrescentar 90 mL de vaselina líquida. Aquecer até a completa fusão da cera. Retirar do fogo e verter sobre uma placa de acrílico perfurada (ver A-2). Deixar esfriar, retirar o excesso da cera sobre a placa de acrílico com a ajuda de uma espátula. Armazenar à temperatura ambiente. No momento do uso, deixar a placa na geladeira durante 30 minutos. Com a ajuda de um bastão de vidro, retirar a cera dos orifícios e colocar em tubos de ensaio de 12 x 120 mm para que se forme um anel vedatório de aproximadamente 1 mm de espessura.

5.2.6.2 Fase inferior (meio para testes de descarboxilação da lisina e de motilidade)

Fórmula:

Extrato de levedura.....	3,0 g
Glicose.....	0,5 g
Nitrato de potássio.....	0,5 g
L-lisina.....	5,0 g
Solução alcoólica de púrpura de bromocresol 0,2%.	10,0 mL
Ágar.....	4,0 g
Água destilada.....	1 000,0 mL
pH final após esterilização: 6,4 ± 0,2	

Preparo:

Pesar o extrato de levedura, a glicose, o nitrato de potássio e o ágar. Acrescentar 1 000 mL de água destilada fria, deixando em repouso durante, aproximadamente, 15 minutos. Aquecer, agitando frequentemente até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Acrescentar a L-lisina. Homogeneizar e ajustar o pH para 6,4 com solução normal de hidróxido de sódio (NaOH-1N). Acrescentar 10 mL da solução alcoólica de púrpura de bromocresol a 0,2%. Homogeneizar e distribuir volumes de 1,5 mL em tubos de ensaio de 12 x 120 mm nos quais já foi colocado o vascar (interfase). Tamponar com algodão hidrófilo e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Após a autoclavação, os tubos contendo o meio devem

ser conservados em posição vertical para a formação do menisco vedatório de vascar. Armazenar em caixas ou em sacos plásticos sob refrigeração (2 a 8°C) durante o período máximo de 4 semanas.

5.2.6.3 Fase superior (meio de Rugai & Araújo)

Fórmula:

Solução 1 (base).....	800,0 mL
Solução 2 (solução de indicador e substratos)..	14,0 mL

Preparo:

Este meio deve ser preparado como se segue:

- preparar a solução 1 (base), com a seguinte composição:

Triptona.....	10,0 g
Extrato de carne.....	2,0 g
Cloreto de sódio.....	5,0 g
Fosfato de sódio dibásico pentaidratado.....	2,0 g
L-triptofano.....	1,0 g
Solução alcoólica de azul de bromotimol 1,5%..	2,0 mL
Ágar.....	11,0 g
Água destilada.....	1 000,0 mL

pH final após esterilização: 7,4 ± 0,2

Preparo:

Pesar os reagentes, com exceção da solução de azul de bromotimol e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria, deixando em repouso durante, aproximadamente, 15 minutos. Aquecer, agitando frequentemente até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Ajustar o pH para 7,4 com solução normal de hidróxido de sódio (NaOH-1N). Acrescentar 2 mL de solução alcoólica a 1,5% de azul de bromotimol. Distribuir em balões. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Armazenar em geladeira (2 a 8°C) ao abrigo da luz.

- preparar a solução 2 (solução de indicador e substratos), com a seguinte composição:

Citrato de ferro amoniacal (verde).....	2,0 g
Tiosulfato de sódio pentaidratado.....	2,0 g
Sacarose.....	80,0 g
Glicose.....	10,0 g
Uréia.....	40,0 g
Água destilada.....	85,0 mL

Preparo:

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

mL e acrescentar 85 mL de água destilada esterilizada. Tamponar com tampa de rosca ou rolha de cortiça esterilizada. Aquecer em banho-maria a 65 °C, agitando freqüentemente até a completa dissolução dos reagentes. Pasteurizar, mergulhando o frasco até o gargalo em banho-maria a 65 °C, durante 1 hora. Armazenar em geladeira (2 a 8 °C), ao abrigo da luz.

5.2.6.4 Corantes utilizados no preparo do IAL

a) Azul de bromotimol (solução alcoólica a 1,5%):

Fórmula:

Azul de bromotimol.....	1,5 g
Álcool etílico absoluto q.s.p.....	100,0 mL

Preparo:

Pesar 1,5 g de azul de bromotimol, colocar em um balão volumétrico e completar o volume para 100 mL com álcool etílico absoluto. Guardar a solução em frasco com tampa de rosca ao abrigo da luz.

b) Púrpura de bromocresol (solução alcoólica a 0,2%)

Fórmula:

Solução normal de hidróxido de sódio (NaOH-1N)	1,0 mL
Água destilada.....	49,0 mL
Púrpura de bromocresol.....	0,2 g
Álcool etílico absoluto q.s.p.....	100,0 mL

Preparo:

Adicionar em um balão volumétrico 1 mL de uma solução normal de hidróxido de sódio (NaOH-1N) a 49 mL de água destilada. Esperar meia hora para estabilizar. A seguir, dissolver 0,2 g de púrpura de bromocresol nesta solução estabilizada. Após a dissolução, completar o volume para 100 mL com álcool etílico absoluto. Guardar a solução em frasco com tampa de rosca ao abrigo da luz.

5.2.6.5 Preparo final do meio de Rugai e lisina-motilidade (IAL)

Fundir a base de meio Rugai & Araújo em banho-maria e estabilizar a 60-65 °C. Adicionar assepticamente a solução de indicador de substratos. Homogeneizar. Distribuir porções de aproximadamente 3 mL em tubos de 12 x 120 mm já contendo a lisina e o vascar, aproveitando a manobra para impregnar o tampão com reativo para indol (ver 5.3.1). Deixar esfriar, inclinando de tal maneira que a base seja aproximadamente 1/3 da altura do ápice. Fazer prova de esterilidade, em estufa a 35 °C por 24 horas.

5.2.7 Ágar nutriente modificado (ágar conservação)

Fórmula:

Extrato de carne.....	4,0 g
Peptona.....	10,0 g
Cloreto de sódio.....	5,0 g
Ágar.....	15,0 g
Água destilada.....	1 000,0 mL
pH final: 7,4 ± 0,2	

Preparo:

Pesar os componentes e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria, deixando em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer, agitando freqüentemente até a completa fusão do ágar, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir volumes de 6 a 7 mL em tubos de 12 x 120 mm. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Após a esterilização, e enquanto o meio estiver ainda quente, colocar os tubos em posição inclinada até que o meio se solidifique.

5.2.8 Meio para verificar a atividade das descarboxilases (Base de Moeller para descarboxilase)

Fórmula:

Peptona.....	5,0 g
Extrato de carne.....	5,0 g
Glicose.....	0,5 g
Púrpura de bromocresol.....	0,01 g
Vermelho de cresol.....	0,005 g
Piridoxal.....	0,005 g
Água destilada.....	1 000,0 mL
pH final: 6,0 ± 0,2 a 25 °C	

Preparo:

Pesar 10,5 g do meio desidratado "Decarboxylase Base Moeller". Aquecer, agitando freqüentemente até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Dividir o meio em três porções de 300 mL e uma quarta porção de 100 mL. À primeira porção, adicionar 3 gramas de L-lisina. À segunda porção, 3 gramas de L-arginina e à terceira porção, 3 gramas de L-ornitina (concentração final dos aminoácidos de 1%). A quarta porção funcionará como controle e, portanto, não receberá nenhum aminoácido. Não é necessário o ajuste do pH para a lisina e arginina. Para a ornitina, que é altamente ácida, ajustar o pH 6,0 ± 0,2 com solução normal de hidróxido de sódio (NaOH-1N). Distribuir volumes de 3 mL em tubos de ensaio

de 12 x 120 mm. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Armazenar sob refrigeração (2 a 8°C).

5.2.9 Meio de OF para oxidação e fermentação

Fórmula:

Triptona.....	2,0 g
Cloreto de sódio.....	5,0 g
Fosfato de potássio dibásico anidro.....	0,3 g
Azul de bromotimol.....	0,08 g
Ágar.....	2,0 g
Água destilada.....	1 000,0 mL
pH final: 6,8 ± 0,2	

Preparo:

Pesar 9,4 g do meio desidratado "OF Basal Medium" e acrescentar 1 000mL de água destilada fria, deixando em repouso durante, aproximadamente, 15 minutos. Aquecer, agitando freqüentemente até a completa fusão do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir volumes de 100 mL em balões de 250 mL e esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Estabilizar à temperatura de 50 °C e adicionar para 100 mL do meio 10 mL de uma solução estéril do açúcar a ser testado a 10%. Homogeneizar e distribuir volumes de 3 a 4 mL em tubos de ensaio de 12 x 120 mm estéreis, tamponados com algodão cardado. Conservar os tubos em posição vertical até que o meio se solidifique.

Nota: A solução de açúcar deve ser esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm estéril.⁸

5.2.10 Meio para a prova de Voges-Proskauer (VP)

Fórmula:

Peptona.....	7,0 g
Fosfato de potássio dibásico anidro.....	5,0 g
Glicose.....	5,0 g
Água destilada.....	1 000,0 mL
pH final após esterilização: 6,9 ± 0,2 a 25°C	

Preparo:

Pesar 17,0 g do meio desidratado "MR-VP Medium" e acrescentar 1 000 mL de água destilada. Aquecer, agitando freqüentemente até a completa

⁸ A filtração de soluções ou de meios de cultura que contêm substâncias termolábeis é feita com vácuo, usando-se membrana de éster de celulose com porosidade de 0,22 µm. Todos os materiais e equipamentos utilizados para filtração deverão ser esterilizados previamente por autoclavagem a 121°C durante 15 minutos.

dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir volumes de 5 mL em tubos de ensaio de 12 x 120 mm. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Armazenar sob refrigeração (2 a 8 °C).

5.2.11 Meio de Mueller Hinton

Fórmula:

Infusão de carne.....	300,0 g
Hidrolisado de caseína.....	17,5 g
Amido.....	1,5 g
Ágar.....	17,0 g
Água destilada.....	1 000,0 mL
pH final após esterilização: 7,4 ± 0,1	

Preparo:

Pesar 38,0 g do meio desidratado "Mueller Hinton Medium" e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria, deixando em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer, agitando freqüentemente até a completa fusão do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Se necessário, ajustar o pH para 7,4 com solução normal de hidróxido de sódio (NaOH-1N). Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Após esterilização, distribuir assepticamente volumes de 15 mL em placas de Petri de 15 x 150 mm.

5.2.12 Ágar nutriente para agente vibriostático O129 (150 µg/mL)

Fórmula:

Caldo nutriente nº 2 (Oxoid).....	25,0 g
Cloreto de sódio.....	5,0 g
Ágar.....	15,0 g
Água destilada.....	1 000,0 mL

Preparo:

Pesar os componentes do meio e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria, deixando em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer, agitando freqüentemente até a completa fusão do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Deixar o meio estabilizar a 50 °C e acrescentar assepticamente 20 mL de uma solução 7,5 mg/mL do agente vibriostático O129. Homogeneizar e distribuir assepticamente volumes de 15 mL em placas de Petri de 15 x 100 mm.

5.3 Soluções⁹

5.3.1 Reativo para indol

Fórmula:

p-dimetilamino benzaldeído.....	1,0 g
Ácido ortofosfórico.....	20,0 g
Álcool etílico absoluto.....	50,0 mL
Água destilada q.s.p.....	100,0 mL

Preparo:

Pesar o p-dimetilamino benzaldeído e acrescentar 50 mL de álcool etílico absoluto. Adicionar o ácido ortofosfórico à água e juntar o p-dimetilamino benzaldeído, dissolvido em álcool. Colocar em vidro com tampa esmerilhada ou de rosca. Para aplicação do reativo para indol no tampão de algodão devem ser observados os seguintes itens:

- colocar aproximadamente 10 mL do reativo em uma placa de Petri esteril, mantida em posição inclinada, contendo papel de filtro esterilizado no fundo;
- não embeber o tampão de algodão diretamente no reativo, mas apenas tocar levemente no papel de filtro;
- trabalhar rapidamente, com assepsia, de preferência em ambiente esteril.

5.3.2 Reagente para o teste de oxidase

Fórmula:

Cloridrato de N, N, N', N'-tetrametil-p-fenilenodiamina..	1,0 g
Água destilada.....	100,0 mL

Preparo:

Pesar 1 g do cloridrato N, N, N', N'-tetrametil-p-fenilenodiamina, acrescentar 100 mL de água destilada e homogeneizar bem até a completa dissolução do reagente. Guardar a solução em frasco âmbar, em geladeira (2 a 8°C), durante no máximo dois dias.

Nota: A adição de ácido ascórbico a essa solução (na concentração de 0,1%) retarda a auto-oxidação do reagente.

5.3.3 Solução de cloreto de cálcio a 1%

⁹ As soluções são estocadas em geladeira (2 a 8°C). São mantidas em frascos bem fechados, com rolha de borracha ou tampa com rosca, pois os tampões de algodão podem permitir a entrada e a conseqüente absorção de substâncias tais como a formalina e a amônia. Soluções alcalinas não devem ser estocadas em frasco de vidro por muito tempo, pois estes frascos são lentamente dissolvidos e íons de metais pesados são posteriormente encontrados nessas soluções.

Fórmula:

Cloreto de cálcio.....	1,0 g
Água destilada.....	100,0 mL

Preparo:

Pesar 1 g de cloreto de cálcio e dissolver em 100 mL de água destilada. Armazenar em frasco bem vedado, previamente esterilizado.

5.3.4 Solução fisiológicaFórmula:

Cloreto de sódio.....	8,5 g
Água destilada.....	1 000,0 mL

Preparo:

Pesar 8,5 g de cloreto de sódio e dissolver em 1 000 mL de água destilada. Homogeneizar bem até completa dissolução do cloreto de sódio. Distribuir volumes de aproximadamente 50 mL em frascos de borossilicato ou vidro neutro. Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Armazenar à temperatura ambiente.

5.3.5 Solução salina a 2%Fórmula:

Cloreto de sódio.....	20,0 g
Água destilada.....	1 000,0 mL

Preparo:

Pesar 20,0 g de cloreto de sódio e dissolver em 1 000 mL de água destilada. Homogeneizar bem até completa dissolução do cloreto de sódio. Distribuir volumes de aproximadamente 50 mL em frascos de borossilicato ou vidro neutro. Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Armazenar à temperatura ambiente.

5.3.6 Solução normal de hidróxido de sódio (NaOH-1N)Fórmula:

Hidróxido de sódio.....	40,0 g
Água destilada.....	1 000,0 mL

Preparo:

Pesar 40 g de hidróxido de sódio. Colocar em um balão volumétrico e adicionar 500 mL de água destilada. Homogeneizar até completa dissolução do hidróxido de sódio e completar o volume para 1 000 mL com água destilada. Armazenar em frasco bem vedado ao abrigo da luz.

5.3.7 Reagentes para prova de VP5.3.7.1 Solução de alfa-naftol a 5%Fórmula:

Alfa-naftol.....	5,0 g
Álcool etílico absoluto.....	100,0 mL

Preparo:

Pesar 5 g de alfa-naftol e diluir em 100 mL de álcool etílico absoluto. Preparar a solução no dia do uso.

5.3.7.2 Solução de hidróxido de potássio a 40%Fórmula:

Hidróxido de potássio.....	40,0 g
Água destilada.....	100,0 mL

Preparo:

Pesar 40 g de hidróxido de potássio e diluir em 100 mL de água destilada. Armazenar em frasco bem vedado ao abrigo da luz.

5.3.8 Solução O/129 (7,5 mg/mL)Fórmula:

O/129 (2,4 diamino-6,7-fosfato de diisopropil pteridina)...	0,75 g
Água destilada estéril.....	100,0 mL

Preparo:

Dissolver o agente O/129 em 100 mL de água destilada e esterilizar em membrana filtrante 0,22 µm. Estocar em geladeira por um período nunca superior a 30 dias.

5.3.9 Solução de desoxicolato de sódio a 0,5%Fórmula:

Desoxicolato de sódio.....	0,5 g
Água destilada.....	100,0 mL

Preparo:

Pesar 0,5 g de desoxicolato de sódio e dissolver em 100 mL de água destilada. Guardar em frasco conta-gotas.

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

Tiosulfato de sódio anidro.....	18,0 g
Água destilada.....	1 000,0 mL

Preparo:

Pesar 18 g de tiossulfato de sódio e dissolver em 1 000 mL de água destilada. Armazenar em frasco bem vedado.

5.3.11 Solução de EDTA a 15%Fórmula:

EDTA (ácido etilenodiaminotetracético).....	150,0 g
Água destilada.....	1 000,0 mL

Preparo:

Pesar 150 g de EDTA e dissolver em 1 000 mL de água destilada. Ajustar o pH para 6,5. Armazenar em frasco bem vedado.

6 EXECUÇÃO DO ENSAIO6.1 Princípio do método

O método baseia-se na inoculação direta ou na concentração de volumes representativos de amostras de água (tratadas, superficiais, subterráneas e esgotos) através da técnica de membrana filtrante ou mecha de gaze (técnica de Moore). As amostras são posteriormente submetidas a dois enriquecimentos consecutivos em água peptonada alcalina, para favorecer o crescimento do V. cholerae. As colônias típicas, isoladas em placas contendo o meio ágar seletivo TCBS, são confirmadas através de teste de triagem, provas bioquímicas e sorológicas.

6.2 Reações6.2.1 Meio de transporte Cary-Blair

Meio semi-sólido para a preservação de espécimes fecais. O pH alcalino e a presença de cloreto de sódio favorecem a sobrevivência do V. cholerae, que pode permanecer viável por até 22 dias neste meio. O tioglicolato de sódio atua como agente redutor, mantendo um baixo potencial de óxido-redução e prevenindo a formação de peróxidos no meio, que normalmente são letais para os microrganismos.

Nota: As amostras que são transportadas em meio Cary-Blair não necessitam de refrigeração.

6.2.2 Água peptonada alcalina

Meio líquido utilizado para o enriquecimento de V. cholerae, onde o pH alcalino (8,8) favorece o desenvolvimento rápido do Vibrio e inibe o crescimento de outras bactérias. O período de incubação não deve ser longo (em média, 8 a 12 horas) para que não haja predominância de outros microrganismos.

6.2.3 Ágar TCBS (ágar tiosulfato, citrato, sais biliares e citrato)

Meio seletivo diferencial largamente utilizado no isolamento de V. cholerae e outros vibriões patogênicos. O V. cholerae utiliza a sacarose, acidificando o meio e produzindo colônias amarelas, devido à viragem dos indicadores de pH, azul de timol e bromotimol. Os sais biliares incorporados ao meio atuam na inibição do crescimento da maioria das bactérias gram-positivas. O citrato de sódio retarda o desenvolvimento dos microrganismos gram-positivos e serve para restringir alguns organismos gram-negativos que são incapazes de utilizar citrato de sódio como fonte de carbono. O tiosulfato de sódio e o citrato férrico permitem a diferenciação dos vibriões das bactérias produtoras de sulfeto de hidrogênio (H₂S).

6.2.4 Ágar Kligler com ferro (Kligler Iron Agar)

- glicose (dextrose) - o V. cholerae fermenta a glicose, com produção de ácido, o que determina o aparecimento de uma coloração amarela no meio, decorrente da viragem do indicador de pH. Na superfície do meio, no entanto, a proliferação é muito abundante e a acidez resultante da fermentação da glicose é neutralizada pelos produtos do metabolismo protéico, determinando o aparecimento da coloração vermelha. Na base do meio, onde o crescimento é menor em relação à superfície, os produutos do metabolismo protéico não são suficientes para neutralizar a acidez, permanecendo a coloração amarelada do meio;
- lactose - o V. cholerae não fermenta a lactose, permanecendo inalterado o ápice do meio (coloração vermelha);
- sulfeto de hidrogênio (H₂S) - o V. cholerae é incapaz de reduzir o tiosulfato a sulfeto de hidrogênio; portanto, não haverá formação do sulfeto férrico, resultante da combinação do íon ferro presente no sulfato ferroso com o sulfeto de hidrogênio, responsável pelo enegrecimento do meio;
- gás - o V. cholerae não produz gás; portanto, não apresentará nenhuma formação de bolhas no meio;
- indol - o V. cholerae produz a enzima triptofanase, sendo portanto capaz de degradar o aminoácido heterocíclico triptofano e formar o indol. A formação do indol é verificada pela presença da cor vermelha nos tampões do meio Kligler, que contêm o reativo p-dimetilaminobenzaldeído.

6.2.5 Meio de Rugai e lisina-motilidade (IAL), segundo Pessoa & Silva

a) Fase inferior: lisina e motilidade

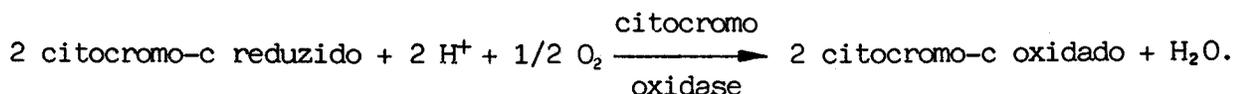
- lisina - o V. cholerae descarboxila este aminoácido através da enzima L-lisina descarboxilase, dando formação à respectiva amina cadaverina. A amina formada neutraliza a acidez do meio proveniente da fermentação da glicose e o alcaliniza o suficiente para fazer com que o indicador púrpura de bromo cresol torne-se cor violeta neste pH;
- motilidade - o V. cholerae é dotado de flagelo, apresentando portanto crescimento difuso em ágar semi-sólido.

b) Fase superior: meio de Rugai & Araújo

- glicose (dextrose) - o V. cholerae fermenta a glicose, com produção de ácido, o que determina o aparecimento de uma coloração amarela no meio, decorrente da viragem do indicador de pH;
- sacarose - o V. cholerae fermenta a sacarose com produção de ácido; assim, o indicador azul de bromotimol torna a superfície do meio amarela;
- gás - o V. cholerae não produz gás; portanto, não apresenta nenhuma formação de bolhas no meio;
- indol - o V. cholerae produz a enzima triptofanase, sendo portanto capaz de degradar o aminoácido heterocíclico triptofano e formar o indol. A formação do indol é verificada, pela presença da cor vermelha nos tampões do meio de IAL, que contém o reativo p-dimetilaminobenzaldeído;
- L-triptofano desaminase (LTD) - o V. cholerae não possui a L-triptofano desaminase, sendo incapaz de desaminar o triptofano e produzir o ácido indol pirúvico;
- urease - o V. cholerae é urease negativa; logo, não desdobra a uréia em amônia (NH_3) e dióxido de carbono (CO_2), não apresentando cor azul na parte inferior, característica das bactérias urease positivas;
- sulfeto de hidrogênio (H_2S) - o V. cholerae é incapaz de reduzir o tiosulfato a sulfeto de hidrogênio; portanto, não haverá formação do sulfeto férrico, resultante da combinação do íon ferro presente no citrato de ferro amoniacal com o sulfeto de hidrogênio, responsável pelo enegrecimento do meio.

6.2.6 Oxidase

O V. cholerae possui a enzima oxidativa citocromo-oxidase, necessária para a oxidação do citocromo-c na cadeia respiratória, segundo a seguinte reação:



No teste de oxidase, o citocromo-c, em sua forma oxidada, catalisa a oxidação do tetrametil-p-fenilenodiamina, formando uma substância de coloração azul.

6.3 Amostragem

Os locais de coleta de amostras devem ser estabelecidos em pontos das redes coletoras de esgoto, Estações de Tratamento de Esgoto (ETE), Es tações Elevatórias e Poços de Visita, que recebam esgoto de partes re presentativas da população; nas possíveis vias de entrada do V. cholerae, sobretudo portos e aeroportos, assim como estações ferroviárias e rodo viárias; nos córregos e rios, que recebam grande quantidade de despejos domésticos e também na água de abastecimento, principalmente quando há suspeita de uma contaminação que possa levar a um surto epidêmico. As amostras devem ser bem identificadas e todas as informações sobre elas devem ser completas (número das amostras, data, local e outros dados necessários), para que os resultados possam ser interpretados correta mente.

6.4 Técnicas de coleta

Basicamente as amostras para a pesquisa de V. cholerae podem ser obti das de duas formas distintas; uma consiste na instalação de uma mecha de gaze em um local estabelecido, durante um determinado intervalo de tempo e posterior retirada (técnica de Moore); a outra, na coleta de uma porção líquida.

6.4.1 Coleta de amostra pela técnica de Moore modificada (mecha de gaze)

A técnica de Moore tem sido amplamente utilizada na pesquisa de V. cholerae em amostras de águas de esgoto e de águas superficiais. A principal vantagem desse método consiste na constante vigilância do lí quido a ser estudado, já que à medida que se retira uma mecha insta la-se outra. Por outro lado, amostragens pontuais em que se obtêm por ções do líquido permitem espaços vazios entre uma coleta e outra, haven do, dessa maneira, uma probabilidade menor de se isolar o V. cholerae. Esta técnica se desenvolve da seguinte maneira:

a) Preparo da mecha

Usar atadura de crepe ou gaze esterilizada. A atadura é dobrada cinco vezes no sentido do comprimento; suas dimensões finais serão de 23 cm de largura por 36 cm de comprimento. A partir da base inferior de 23 cm, cortam-se cinco tiras de 4,5 cm de largura e 26 cm de comprimento, dei xando-se, portanto, 10 cm na parte superior sem cortar, onde será fixa

do o fio de náilon (3m) para amarrar e manter suspensa a mecha. Embrulhar em papel Kraft e autoclavar a 121 °C durante 15 minutos (ver Figuras 1 e 2).

b) Instalação da mecha

A mecha deverá ser instalada nos pontos de coleta, de forma que fique imersa no esgoto e águas superficiais e o fio de náilon fique firmemente preso em uma estrutura fixa no ponto de coleta.

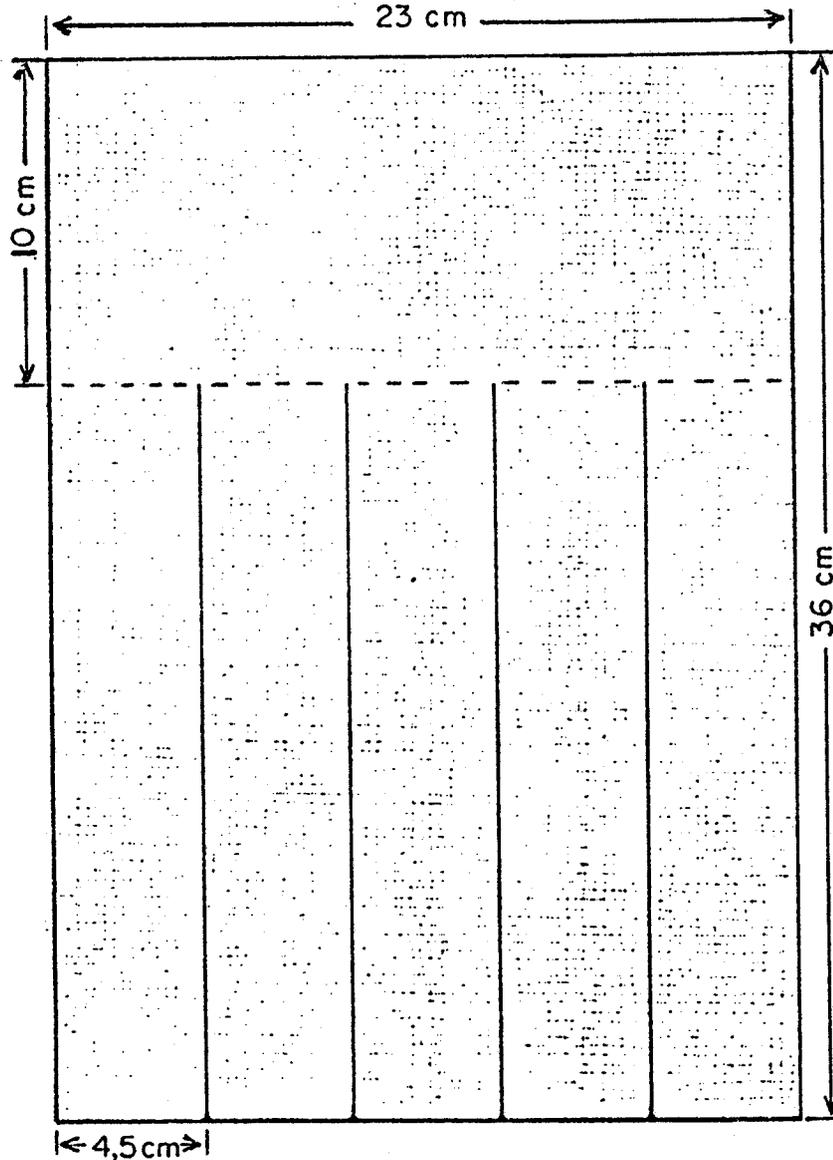


FIGURA 1 - Dimensões da mecha de Moore

Nota: Em represas e rios, é recomendada a colocação de um peso na mecha para que possa ficar completamente submersa.

c) Retirada da mecha

Retirar a mecha após o período determinado (de 3 a 7 dias), tomando as medidas de segurança necessárias (ver A-1). Para isso, proceder da seguinte forma:

- identificar as amostras, preenchendo corretamente a ficha de coleta

- ta : nº da amostra, data, local, chuvas, etc.;
- retirar a mecha e introduzi-la no recipiente de coleta (saco de plástico ou frasco) contendo 300 mL do meio de transporte Cary e Blair;¹⁰
 - fechar o saco plástico ou recipiente de coleta e acondicionar em caixa apropriada para transporte.

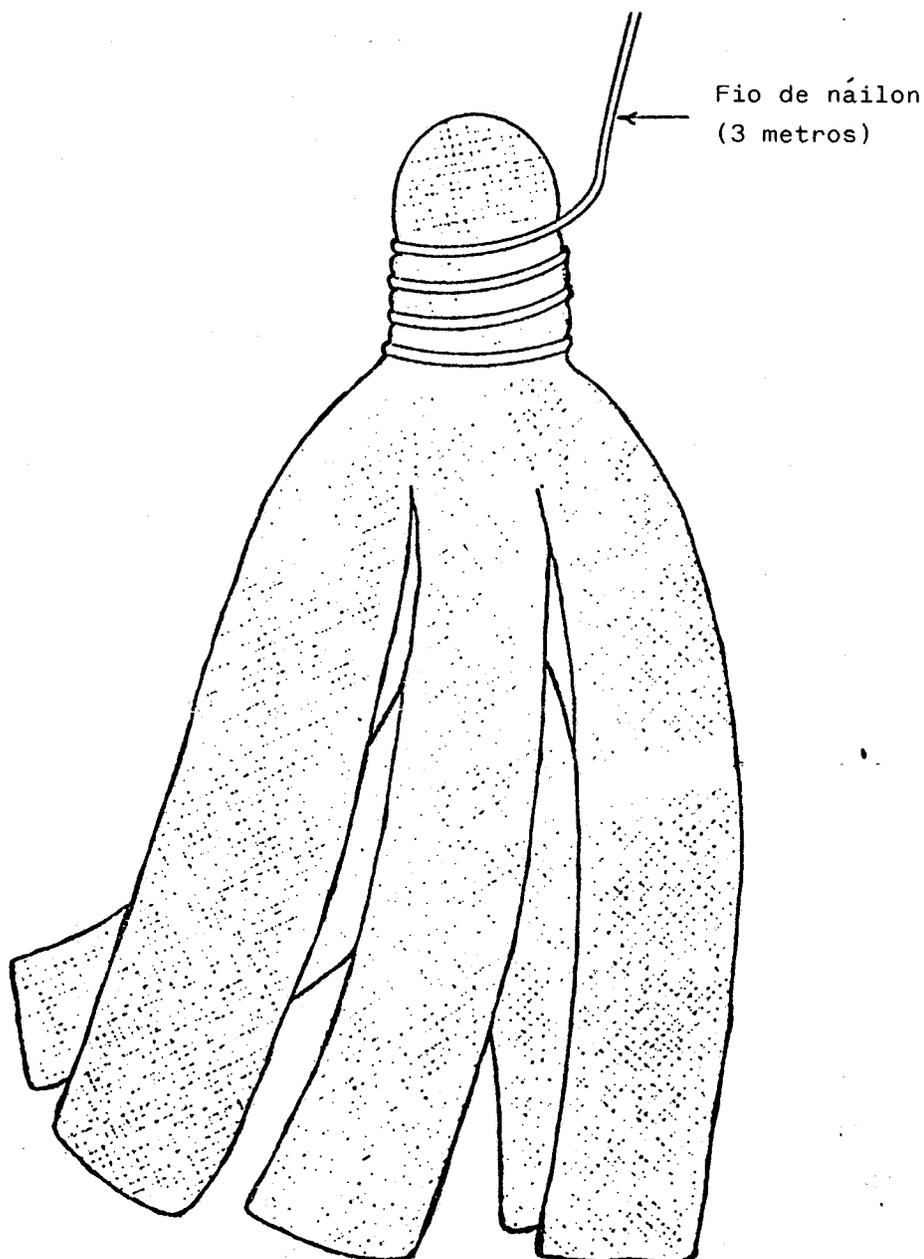


FIGURA 2 - Mecha de gaze pronta (técnica de Moore)

d) Transporte e preservação da amostra

As amostras colhidas e transportadas em meio de Cary e Blair não neces

¹⁰ A pessoa indicada para execução desta tarefa deverá ser devida e adequadamente protegida de modo a evitar problemas de contaminação. O uso de luvas, máscaras e botas é obrigatório. Após a coleta, retirar as luvas e colocar em solução desinfetante (ver A-1.2). Quando tampar o frasco ou fechar o plástico, não tocar com luvas sujas, pois o material é altamente contaminado e pode causar riscos à saúde do coletor ou do técnico durante a manipulação da amostra.

sitam de refrigeração; no entanto, para municípios distantes onde o transporte seja rodoviário, recomenda-se refrigerar a caixa de transporte para se manter uma temperatura de 10 a 20°C. É adequada a utilização de sistemas de gelo reaproveitável, acondicionados em plásticos do tipo "camping". Amostras preservadas em meio de Cary e Blair devem ser processadas dentro do período de 24 a 72 horas após a coleta; salvo em condições e situações especiais.

6.4.2 Coleta de amostras líquidas

A coleta de amostras de água deve ser realizada segundo o Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água (CETESB/SEMA-1988), sendo que para as amostras de água doce devem ser adicionadas duas colheres de chá de cloreto de sódio (aproximadamente 10 g) por litro de amostra (concentração final de 1% de NaCl). A adição de cloreto de sódio propiciará uma maior viabilidade do V. cholerae na amostra coletada.

A coleta de amostras líquidas obedece aos seguintes itens:

a) agente neutralizador do cloro residual

Para a coleta de amostras de água tratada deve-se adicionar aos frascos 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, requer-se uma maior quantidade de tiosulfato. 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.

b) agentes quelantes

Para a coleta de amostras de água poluída e de esgoto, suspeitas de conter concentrações superiores a 0,1 mg/L de metais pesados, tais como cobre, zinco, etc., deve-se adicionar ao frasco de coleta, antes de sua esterilização, 0,3 mL de uma solução a 15% de EDTA, para cada 100 mL da amostra, além do tiosulfato de sódio (volumes de 0,1 mL de uma solução a 10% para cada 100 mL da amostra). A solução de EDTA pode ser adicionada ao frasco de coleta separadamente ou já combinada com a solução de tiosulfato de sódio antes da adição. O EDTA atua como agente quelante, reduzindo a ação tóxica de metais, apresentando uma ação mais ampla que o tiosulfato de sódio, que, na concentração empregada, previne apenas a ação bactericida do cobre.

c) transporte e conservação

Após a coleta, as amostras de água deverão ser enviadas ao laboratório o mais rápido possível. O tempo ideal entre a coleta e o início do exame é de duas a seis horas, sendo que o tempo limite não deve exceder 24 horas. Para amostras que não possam ser entregues no laboratório num período de seis horas decorrido entre a coleta e o início do exame, deve-se ajustar o pH para 9,2 com hidróxido de sódio 1N (NaOH-1N) e acrescentar telurito de potássio em concentração final de 1:200 000 (0,005 g de telurito de potássio por litro de amostra). A finalidade da adição do telurito é inibir o desenvolvimento de outras bactérias que possam interferir na detecção do V. cholerae. Transportar sob refrigeração (4 a 10°C).

d) volume da amostra

O volume da amostra a ser coletado depende do tipo e da característica da água a ser analisada; entretanto, recomenda-se um volume mínimo para os seguintes tipos de amostra:

Água de esgoto.....	100 mL
Água superficial.....	5 litros
Água para consumo.....	10 litros

6.5 Métodos de concentração de V. cholerae

Os vibriões são excretados em grande número (10^6 - 10^9 bactérias/grama de fezes), junto com as fezes de pacientes infectados; entretanto, como eles se diluem nos vários tipos de água, há necessidade de se usarem técnicas de concentração para obter êxito no isolamento. Este procedimento deve ser reforçado, considerando-se os indivíduos assintomáticos e convalescentes que excretam os vibriões em quantidade reduzida (10^3 - 10^5 bactérias/grama de fezes) e de forma intermitente, tornando-se necessário analisar grandes volumes de água para a detecção do V. cholerae. A concentração do V. cholerae em amostras ambientais pode ser obtida por diversas metodologias, tais como: terra diatomácea, adsorção em hidróxido de alumínio, membrana filtrante, centrifugação, técnica de Moore, etc. A escolha do método adequado vai depender do tipo de amostra a ser analisada e da capacidade analítica do laboratório. As técnicas mais comumente utilizadas para análise de V. cholerae são: técnica de membrana filtrante e a técnica de Moore modificada. O método de concentração em que se utiliza a membrana filtrante tem a vantagem de poder processar grandes volumes de água, principalmente para águas com baixa turbidez, aumentando a probabilidade de isolamento do Vibrio. Por outro lado, a técnica de Moore permite uma vigilância constante da amostra,

não existindo espaços vazios entre uma coleta e outra.

6.5.1 Técnica de membrana filtrante¹¹

6.5.1.1 Dispor sobre a bancada de trabalho o material necessário à execução de análise, a saber:

- a) vasilhame de pressão conectado à bomba de pressão positiva;
- b) porta-filtro de 142 ou 293 mm de diâmetro, previamente esterilizado, conectado ao vasilhame de pressão;
- c) membranas filtrantes estéreis com 142 ou 293 mm de diâmetro e 0,45 µm de porosidade;
- d) um erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de água peptonada alcalina de concentração dupla;
- e) pinça e tesoura com as extremidades mergulhadas em álcool;
- f) bico de Bunsen.

6.5.1.2 Preparo do porta-filtro

- a) retirar a parte superior do porta-filtro e, com uma pinça flambada e esfriada, colocar uma membrana filtrante estéril, centralizando-a sobre a parte inferior do porta-filtro;
- b) acoplar a parte superior do porta-filtro, tendo o cuidado de não danificar a membrana.

6.5.1.3 Filtração da amostra

- a) homogeneizar a amostra e verter cuidadosamente o volume a ser examinado no vasilhame de pressão;
- b) fechar o vasilhame de pressão, ligar a bomba de pressão positiva e proceder à filtração, a uma pressão de 147,1 kPa;
- c) desligar a bomba ao finalizar a operação; abrir a válvula de segurança do vasilhame de pressão e do porta-filtro;
- d) retirar a parte superior do porta-filtro, tendo cuidado para não danificar a membrana e transferir a membrana para 100 mL de água peptonada alcalina concentração dupla.

6.5.2 Técnica de Moore modificada (ver 6.4.1)

6.6 Procedimento de isolamento e identificação de V. cholerae

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

¹¹ O analista indicado para execução dessa tarefa deverá ser devidamente treinado e adequadamente protegido, de modo a evitar problemas de contaminação.

6.6.2 Dispor sobre a bancada de trabalho o material necessário à execução da análise, a saber:

- a) frascos e sacos plásticos de coleta contendo a amostra a ser analisada;
- b) erlenmeyers contendo água peptonada alcalina concentração dupla, previamente identificados com o número da amostra;
- c) alça de inoculação, bicos de Bunsen, placas de Petri, contendo TCBS, máscaras cirúrgicas e pipetas graduadas de 10 mL estéreis.

Nota: Colocar máscara cirúrgica e luvas durante a manipulação das amostras.

6.6.3 Enriquecimento e isolamento

6.6.3.1 Procedimento

a) Amostra obtida através da técnica de Moore

Abrir cuidadosamente o saco plástico externo contendo a amostra; com auxílio de uma pipeta estéril, munida de um pipetador de segurança ou pera de borracha, perfurar o saco interno, homogeneizar a amostra e transferir 10 mL para um erlenmeyer de 125 mL, contendo 10 mL de água peptonada alcalina de concentração dupla. Incubar a 35-37 °C durante 6 a 8 horas.

b) Amostra obtida através da técnica de membrana filtrante

Transferir a membrana com a amostra para um erlenmeyer contendo 100 mL de água peptonada alcalina concentração simples. Incubar a 35-37 °C durante 6 a 8 horas;

c) Inoculação direta

Inocular 900 mL da amostra de água em 100 mL de água peptonada alcalina 10 vezes concentrada ou 450 mL de água em 50 mL de APA 10 vezes concentrada. Incubar a 35-37 °C, durante 6 a 8 horas.

6.6.3.2 Após o período de incubação, retirar cuidadosamente o erlenmeyer da incubadora, evitando agitação.

6.6.3.3 Com auxílio de uma alça de inoculação, devidamente flambada e esfriada, colher o material da superfície do meio de enriquecimento (APA)¹² e semear em duas placas de ágar TCBS, conforme descrito abaixo:

- a) depositar o inóculo em um ponto nas bordas da placa contendo o meio seletivo e diferencial TCBS, girar a placa e

¹² O meio de cultura apresenta uma turvação homogênea, com ou sem película.

iniciar o espalhamento do inóculo na superfície do primeiro quadrante (ver Figura 3), tomando cuidado para que a parte encurvada da alça toque apenas a superfície do meio, evitando ferir o ágar;

- b) girar novamente a placa, flambar a alça de inoculação, esfriar e continuar o espalhamento no segundo quadrante a partir do inóculo do primeiro quadrante (ver Figura 4);

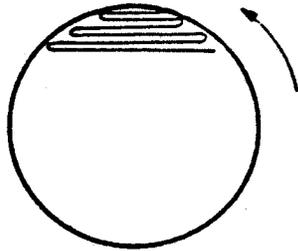


FIGURA 3

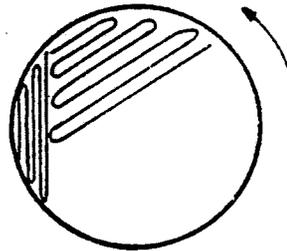


FIGURA 4

- c) proceder desta maneira até completar a sementeira em toda a superfície do ágar, com a finalidade de obter isolamento completo no quarto quadrante (ver Figuras 5 e 6);

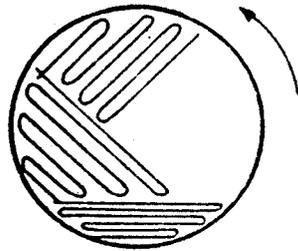


FIGURA 5

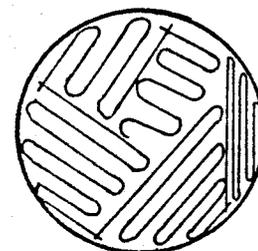


FIGURA 6

- d) fechar e incubar a placa em posição invertida, a 35-37°C, por um período de 18 a 24 horas.

6.6.3.4 Paralelamente à sementeira em placas e com auxílio de uma pipeta estéril, munida de uma pera de borracha ou de um pipetador de segurança, transferir 1 a 2 mL do material da superfície do meio de cultura para dois tubos de ensaio contendo 10 mL de água peptonada alcalina (APA) concentração simples (segundo enriquecimento).

6.6.3.5 Incubar os tubos de ensaio (APA) inoculados a 35-37°C durante 6 a 8 horas.

6.6.3.6 A partir do crescimento superficial do segundo enriquecimento em APA, sem agitar os tubos, inocular duas placas de ágar TCBS, segundo 6.6.3.3.

6.6.3.7 Após 18-24 horas, efetuar a leitura das placas de ágar TCBS,

separando aquelas que apresentarem colônias típicas de V. cholerae (colônias amarelas com halo e ligeiramente convexas).

6.6.3.8 Com todos os cuidados de assepsia e utilizando uma alça devidamente flambada e esfriada, selecionar do ágar TCBS dez colônias típicas de V. cholerae amarelas (sacarose positiva), com halo, brilhantes e convexas, e transferir para o meio de Rugai e lisina motilidade (IAL) ou meio de "Kligler Iron Agar". A inoculação dos meios de triagem é feita por picada em profundidade e estrias na superfície inclinada e a incubação é realizada a 35-37 °C, durante 18 a 24 horas.

6.6.3.9 Após o período determinado de incubação, efetuar a leitura dos resultados.

6.6.3.10 Leituras das características bioquímicas do V. cholerae no meio "Kligler Iron Agar".

a) ápice

- lactose negativa: evidenciada pela coloração vermelha no ápice do meio.

b) base

- glicose positiva: evidenciada pela coloração amarela na base do meio.

- gás negativo: ausência de bolhas no meio;

- sulfeto de hidrogênio negativo (H₂S): ausência da coloração negra no meio.

c) tampão de algodão com reativo de indol

- indol positivo: coloração vermelha no tampão.

6.6.3.11 Leitura das características bioquímicas do V. cholerae no meio de Rugai lisina motilidade (IAL).

a) fase inferior:

- motilidade positiva: crescimento difuso a partir da picada;

- lisina-descarboxilase positiva: cor violeta (nas primeiras horas de incubação, o meio adquire coloração amarela, mas, após o período total previsto para a incubação, o meio readquire a cor violeta inicial).

b) fase superior (superfície e profundidade):

- triptofano desaminase negativa: não se verifica a coloração acastanhada na superfície inclinada;

- sacarose positiva: coloração amarela na superfície da fase superior (ápice);

- glicose positiva: evidenciada pela coloração amarela na profundidade da fase superior;

- gás negativo: ausência de bolhas na profundidade e fase superior;
- sulfeto de hidrogênio (H₂S) negativo: ausência da coloração ne
gra no meio;

c) tampão de algodão com reativo de indol:

- indol positivo: coloração vermelha no tampão.

Resultados do V. cholerae nos meios de triagem.

Sacarose	+
Glicose	+ (ácido sem gás)
LDC	+ (lisina descarboxilase)
Motilidade	+
H ₂ S	-
Indol	+ (86%)
Lactose	-
LTD	- (L-triptofano desaminase)
Urease	-

6.6.3.12 Realizar o teste de oxidase apenas com as culturas que apre-
sentarem reações características de V. cholerae no meio de IAL e "Kligler
Iron Agar", e descartar os tubos restantes.

Nota: A pesquisa de oxidase não deve ser realizada diretamente do
meio de IAL, sendo necessário repicar as culturas previamente
para ágar conservação.

6.6.3.13 Pesquisa da oxidase: com uma agulha de inoculação de plati-
na, devidamente flambada e esfriada, retirar do meio de Kligler ou
ágar conservação um pequeno inóculo da cultura de 18 a 24 horas e tocar
o papel de filtro embebido em solução de cloridrato de N, N, N', N'-
tetrametil-p-fenilenodiamina a 1%. A reação positiva é evidenciada
pelo desenvolvimento de coloração púrpura intensa em, aproximadamente,
30 segundos. Se nenhuma - ou discreta - reação se desenvolver no perí-
do de dois minutos de observação, considerar a prova como negativa.

6.6.3.14 Prosseguir com as culturas que apresentarem reação de oxida-
se positiva e descartar as restantes.

6.6.3.15 A partir de cada cultura oxidase-positiva e com auxílio de
agulha de inoculação devidamente flambada e esfriada, transferir do
meio de Kligler ou IAL um inóculo do crescimento para um tubo contendo
ágar nutriente modificado, previamente identificado. A inoculação é
feita através de estrias no ápice. Após a transferência, incubar os tu-
bos de ágar nutriente a 35-37°C durante um período de 18 a 24 horas.

6.6.4 Testes sorológicos

A partir das culturas de 24 horas no meio de Kligler ou IAL (já transferidas para o ágar nutriente), realizar os testes sorológicos de acordo com o procedimento descrito abaixo.

6.6.4.1 Introduzir, em cada tubo de Kligler ou IAL com a cultura em teste, uma pequena quantidade de algodão hidrófilo. A seguir, utilizando uma pipeta Pasteur, adicionar aos tubos cerca de cinco gotas de solução fisiológica (0,85% NaCl).

6.6.4.2 Com a ponta de pipeta Pasteur, passar delicadamente o algodão na superfície do meio de cultura, deslocando o crescimento bacteriano e obtendo uma suspensão densa da cultura em solução fisiológica.

6.6.4.3 Ainda com a pipeta Pasteur, colher um inóculo da suspensão da cultura e distribuir uma gota em cada um de dois quadrados de uma placa de vidro com quadriculado em sua superfície de 20 x 20 mm, adaptada a uma caixa de Huddlenson.

6.6.4.4 Adicionar a uma das gotas da suspensão, uma gota de soro polivalente anti-V. cholerae 01 e à outra, uma gota de solução salina 2%.

6.6.4.5 Efetuar a homogeneização do soro e da solução salina com a suspensão bacteriana, usando pequenos bastões de vidro, alça de inoculação ou palitos de madeira estéreis, fazendo movimentos circulares durante 2 a 8 minutos.

6.6.4.6 Proceder à leitura, verificando se ocorreu ou não aglutinação; se a bactéria em teste for V. cholerae 01, ocorrerá reação antígeno-anticorpo, que será visualizada pela aglutinação no quadrado com soro e ausência de aglutinação no quadrado com solução salina; se a cultura em teste for rugosa, haverá aglutinação com o soro e com a salina; neste caso, a cultura deverá ser enviada a um laboratório de referência para exames específicos.

6.6.4.7 As culturas de V. cholerae 01 devem ser submetidas a testes sorológicos para determinação dos sorotipos Inaba e Ogawa e provas complementares para a diferenciação entre o V. cholerae 01 biotipo cholerae e V. cholerae 01 biotipo eltor (ver Tabela 1), comumente realizados pelos laboratórios de referência de Vibrio ao nível de competência estadual e federal.

6.6.4.8 Após o período determinado de incubação, os tubos contendo as culturas em ágar nutriente (ver 6.6.3.15), cujos testes sorológicos revelaram a ocorrência de aglutinação, serão identificados, tamponados

com rolha de borracha estéril para posterior identificação bioquímica.

6.6.5 Diferenciação entre Vibrio e outros organismos oxidase-positiva (ver Tabela 2).

TABELA 1 - Diferenciação entre V. cholerae biotipo cholerae e V. cholerae biotipo eltor

Teste de Laboratório	<u>V. cholerae</u> Biotipo eltor	<u>V. cholerae</u> Biotipo cholerae	Observações
Hemólise de eritrócitos de carneiro - Ágar sangue 5%	(+)	(-)	Há biotipo eltor (-)
Hemaglutinação (1 gota de suspensão espessa de bactérias + 1 gota de suspensão a 2,5% de eritrócitos de galinha)	(+)	(-)	-Culturas velhas do biotipo cholerae poderão ser positivas. -Há biotipo eltor que não é hemaglutinante.
Teste de Voges-Proskauer (em meio de Clark Lubs 18-24 horas).	(+)	(-)	Pode ser variável principalmente para o biotipo eltor.
Sensibilidade ao sulfato de polimixina B (discos com 50 unidades);	(-) resistente	(+) sensível	Melhor meio para o teste: Mueller Hinton
Sensibilidade ao fago Clássico IV Eltor 5	(-) resistente (+) sensível	(+) sensível (-) resistente	— —

6.6.5.1 Teste do fio ("string test"): com uma alça de inoculação, devidamente flambada e esfriada, transferir um pequeno inóculo do crescimento do ágar nutriente inclinado para uma lâmina contendo uma gota de solução aquosa a 5% de desoxicolato de sódio e misturar.

- reação positiva: a suspensão perde a turbidez e forma-se um fio mucoso quando se levanta lentamente a alça;
- reação negativa: ausência da formação de fio após 2 minutos

Nota: O resultado do teste do fio não interfere no prosseguimento da pesquisa, servindo apenas para auxiliar o diagnóstico.

6.6.5.2 Teste para verificar a atividade das descarboxilases ("Decarboxylase Base Moeller")

Com uma alça de inoculação, devidamente flambada e esfriada, retirar uma pequena quantidade do crescimento do ágar conservação de 18 a 24 horas e inocular em um tubo com meio para teste da descarboxilação da lisina, um tubo para descarboxilação da ornitina, outro tubo com o meio para o teste da hidrólise de arginina e um quarto tubo contendo

Inocular a cultura em teste 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 35-37 °C e observar diariamente durante 14 dias. Efetuar a leitura, considerando:

- a) coloração amarela: fermentação do açúcar;
- b) coloração verde: ausência de fermentação.

6.6.5.4 Teste de oxidação da glicose, segundo Hugh & Leifson (OF)

Para o teste de oxidação, inocula-se o meio de Hugh & Leifson com glicose pelo procedimento de picada (profundidade de 2 a 3 mm). Incubar a 35-37 °C e observar diariamente durante 4 dias. Efetuar a leitura, considerando:

- coloração amarela: oxidação do açúcar;
- coloração verde: ausência de oxidação.

6.6.5.5 Sensibilidade ao sulfato de polimixina

Para esta prova, pode-se usar discos impregnados com 50 µg de polimixina B ou incorporação de 15 µg/mL do antibiótico ao meio de Mueller-Hinton. A partir da cultura em teste (em caldo nutriente com 2 a 4 horas de incubação), inocular placas de meio Mueller Hinton, com auxílio de um "swab" estéril. Deve-se fazer sempre placas controle com culturas conhecidas de V. cholerae biotipo cholerae (clássico) e V. cholerae biotipo eltor. Colocar os discos de polimixina 50 µg, fazendo uma leve pressão sobre o meio de cultura, e deixar durante aproximadamente uma hora a 4 °C. Logo após, incubar a 35-37 °C durante 18 horas. O V. cholerae biotipo cholerae (clássico) é sensível a essa concentração de polimixina, apresentando um halo de inibição ao redor do disco. O biotipo eltor é resistente ao antibiótico nessa concentração e não apresenta nenhuma zona de inibição ao redor do disco.

6.6.5.6 Prova de Voges-Proskauer

Inocular um tubo com meio de MR-VP (Clark Lubs) com a cultura em teste e incubar a 35-37 °C durante 24 horas. Transferir 1 mL da cultura para um tubo de ensaio. Adicionar 0,6 mL da solução alcoólica de alfa naftol a 5% e 0,2 mL de uma solução de hidróxido de potássio a 40%, agitando bem após a adição de cada solução. Reação positiva ocorre imediatamente ou dentro de 5 minutos e é indicada pelo aparecimento de uma coloração vermelha. O desenvolvimento de uma coloração alaranjada em alguns testes deverá ser descartada.

6.6.5.7 Teste de sensibilidade ao agente vibriostático O/129

Para o teste de sensibilidade ao agente O/129 (2,4-diamino-6,7-fosfato de

diisópropil pteridina), preparar caldo das culturas em teste (BHI¹³-14 a 16 horas, 35-37°C) e inocular as placas de ágar nutriente contendo O/129 na concentração de 150µg/mL. Paralelamente, realizar placas-controle sem o agente vibriostático. As culturas que apresentarem crescimento na placa-controle e ausência de crescimento na placa contendo O/129 são consideradas sensíveis ao agente vibriostático.

6.6.6 Teste para verificar a fermentação da manose, sacarose e arabinose, segundo classificação de Heiberg

Para o teste de fermentação, os tubos contendo o meio de Hugh & Leifson (OF) com manose, sacarose e arabinose a 1% são previamente aquecidos em banho-maria durante dez minutos - para remoção do oxigênio existente em seu interior - e esfriados rapidamente antes do uso. Inocular a cultura em teste 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 35-37°C e observar durante 14 dias. Efetuar a leitura, considerando:

- a) coloração amarela: fermentação do açúcar;
- b) coloração verde: ausência de fermentação.

Nota: V. cholerae, segundo o padrão de fermentação da manose, sacarose e arabinose, pode ser classificado em oito diferentes grupos de Heiberg. Na Tabela 3, são apresentados os grupos bioquímicos de Heiberg, sendo os grupos I e II os mais comumente associados às epidemias de cólera.

TABELA 3 - V. cholerae - Grupos bioquímicos de Heiberg

Grupo	Manose	Sacarose	Arabinose
I	+	+	-
II	-	+	-
III	+	+	+
IV	-	+	+
V	+	-	-
VI	-	-	-
VII	+	-	+
VIII	-	-	+

¹³ Brain Heart Infusion.

6.6.7 Diferenciação bioquímica das espécies do gênero Vibrio

Em determinadas circunstâncias específicas, se faz necessária uma identificação bioquímica mais completa para a diferenciação do V. cholerae das demais espécies do gênero Vibrio, sendo, nesse caso, utilizadas as provas bioquímicas recomendadas por Colweel, R.R. (1984) e Baumann et al. (1984).

Nota: O esquema de procedimento completo é apresentado na Figura 7.

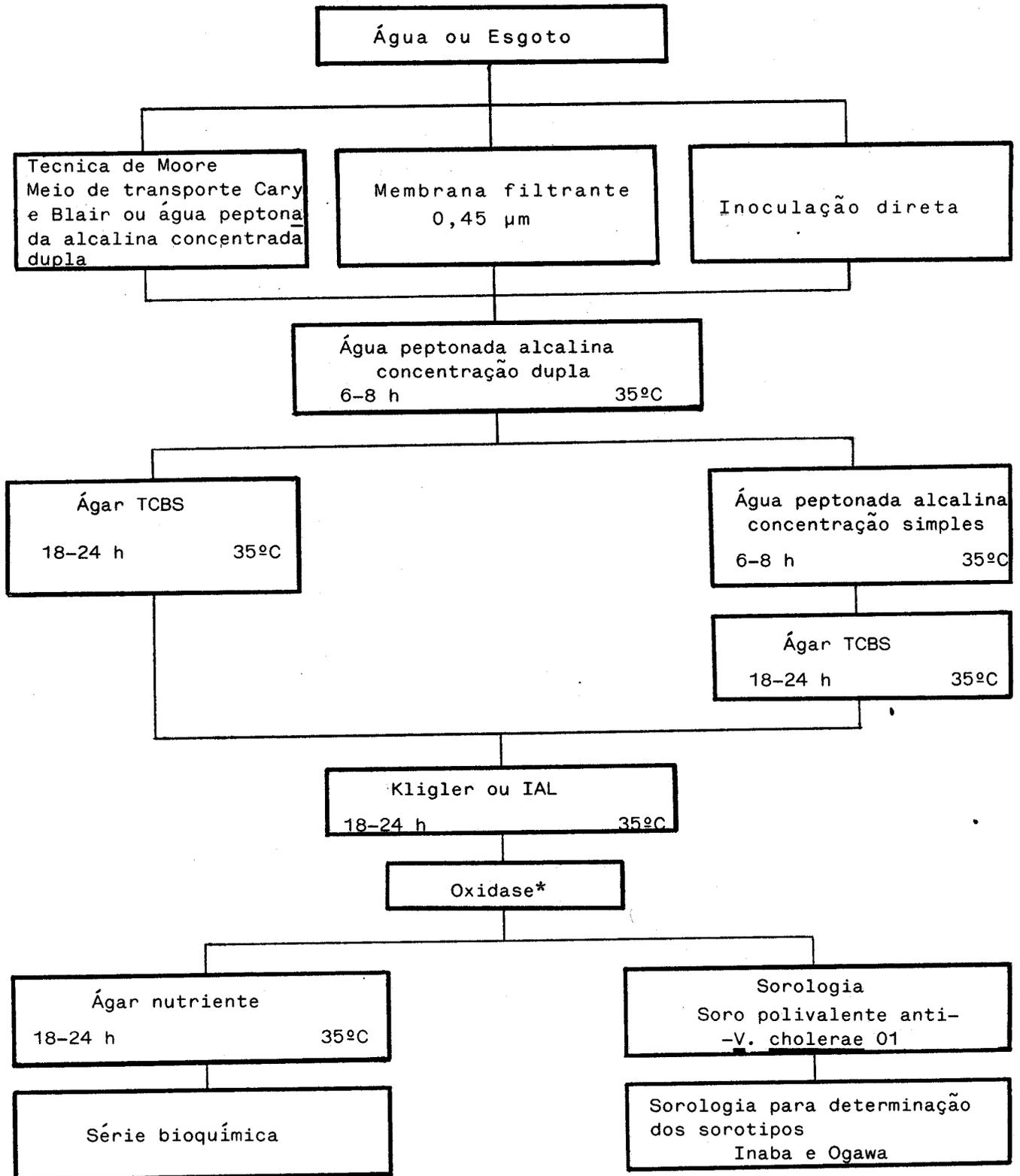
6.7 Determinação de V. cholerae em amostras de água pela técnica de tubos múltiplos

A quantificação de V. cholerae em uma dada amostra pode ser efetuada pela determinação do número mais provável, através da técnica dos tubos múltiplos. Esta técnica consiste na inoculação de volumes decrescentes da amostra em meio de cultivo adequado para o crescimento dos microrganismos investigados, sendo cada volume inoculado em cada série de tubos. Através de sucessivas diluições da amostra, são obtidos inoculos, cuja semeadura oferece resultados negativos em pelo menos um tubo da série em que os mesmos foram inoculados e a combinação de resultados positivos e negativos permite uma estimativa da densidade original das bactérias investigadas (NMP), através da aplicação de cálculos de probabilidade.

Para a determinação do número mais provável de V. cholerae em amostras de água os volumes inoculados são normalmente superiores aos dos utilizados para os indicadores de contaminação fecal, já que o V. cholerae se encontra em menores densidades nessas amostras (ver 6.5). Os volumes mais comumente utilizados para águas superficiais são 1 000, 100 e 10 mL, em série de 3 tubos, devido ao alto custo dos meios necessários para análise de Vibrio cholerae. Os volumes de 1 000 e 100 mL são concentrados em membrana filtrante e inoculados em meio de enriquecimento (APA).

6.7.1 Procedimento do método

- a) Preparar o material necessário para realização de cada amostra e dispor na bancada em ordem:
 - 3 erlenmeyers de 300 mL, contendo 100 mL de água peptonada alcalina para volumes de 1 000 mL da amostra.
 - 3 erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL de água peptonada alcalina para volumes de 100 mL da amostra.
 - 3 tubos de 18 x 180 mm, contendo 10 mL de água peptonada alcalina concentração dupla para volumes de 10 mL da amostra.



* O teste de oxidase não deve ser realizado diretamente do meio de IAL.

FIGURA 7 - Esquema de procedimento

- b) Proceder à marcação dos erlenmeyers, anotando o número da amostra, o volume selecionado da amostra a ser inoculado, a data e as posições que cada um dos erlenmeyers ocupar na série de 3, com as letras A, B e C (ver Figura 8).
- c) Para a série de 1 000 mL: homogeneizar a amostra, medir um volume de 3 litros e verter cuidadosamente no vasilhame de pressão já conectado à bomba de vácuo e ao porta-filtro de 142 mm, contendo membrana filtrante de 0,45 μ m de porosidade. Conectar a bomba e proceder à filtração. A seguir, desconectar a bomba e retirar cuidadosamente a parte superior do porta-filtro e, com ajuda de uma pinça e uma tesoura, cujas extremidades tenham sido flambadas, dobrar a membrana ao meio e cortar em 3 partes iguais. Colocar cada uma das partes (concentração correspondente ao volume de 1 000 mL) nos erlenmeyers contendo 100 mL de APA, cortando cada pedaço em tiras pequenas. Homogeneizar bem para o desprendimento do material da superfície da membrana.
- d) Para série de 100 mL: homogeneizar a amostra, medir um volume de 100 mL e proceder à filtração no porta-filtro de 47 mm e membrana de 0,45 μ m de porosidade, como segue:
- retirar a parte superior do porta-filtro e, com uma pinça flambada e esfriada, colocar na base do suporte do filtro uma membrana estéril de 0,45 μ m de porosidade.
 - recolocar a parte superior do porta-filtro, tendo cuidado para não danificar a membrana. Ajustar e rosquear.
 - verter cuidadosamente no porta-filtro 100 mL da amostra, evitando que a água respingue;
 - ligar a bomba de vácuo e proceder à filtração;
 - após a filtração da amostra, enxaguar o porta-filtro três vezes, com porções de 20-30 mL de água de diluição estéril;
 - desligar a bomba de vácuo ao finalizar a operação. Evitar secagem excessiva da membrana filtrante;
 - retirar a parte superior do porta-filtro e, com auxílio de uma pinça flambada e esfriada, retirar a membrana e colocá-la no erlenmeyer contendo 50 mL de APA, cortando em tiras pequenas;
 - recolocar a parte superior do porta-filtro e lavar com 20 a 30 mL de água de diluição estéril e proceder à filtração de mais dois volumes de 100 mL, para completar a

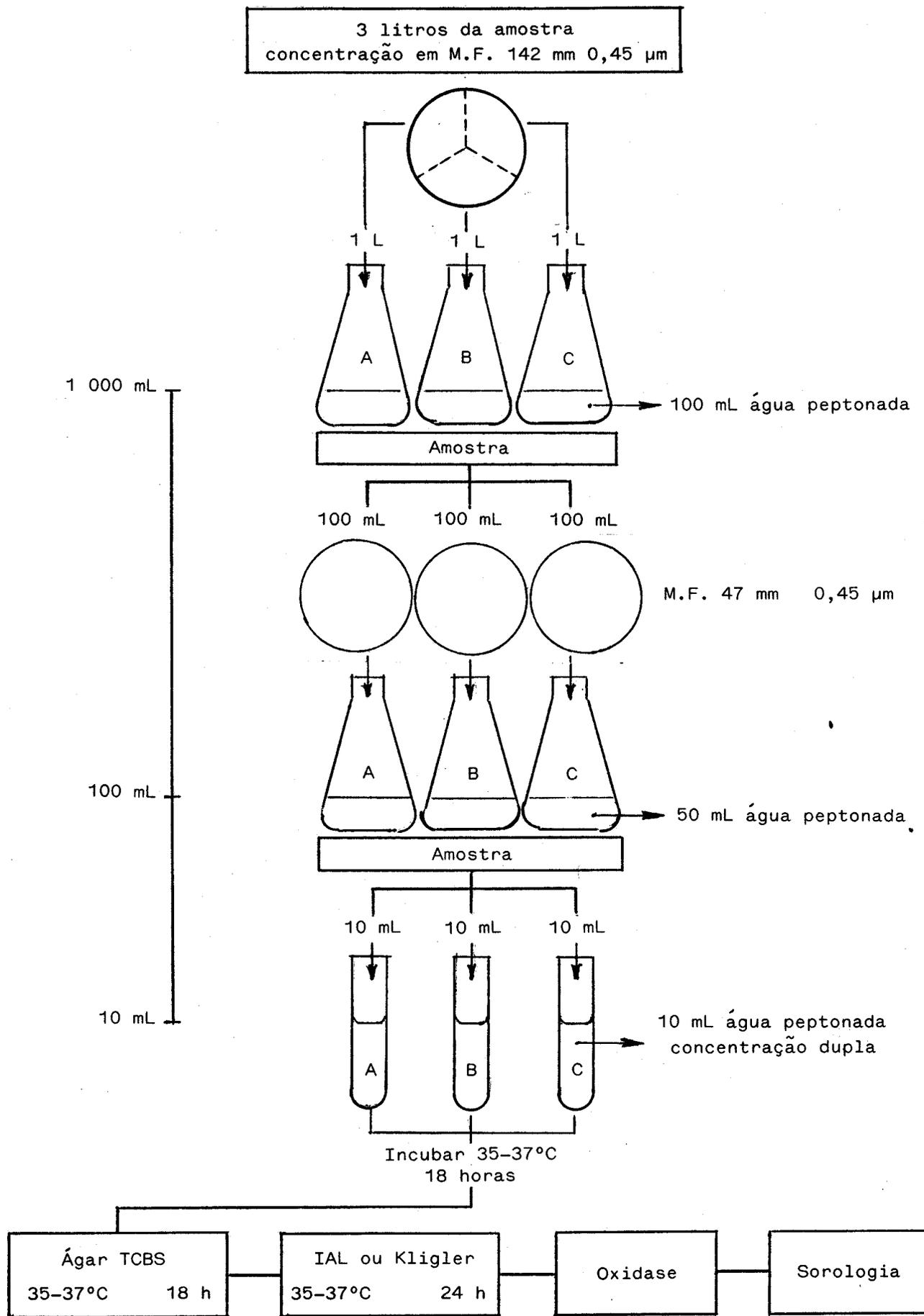


FIGURA 8 - Esquema de Procedimento

série de 3.

- e) Para série de 10 mL: homogeneizar a amostra e transferir 10 mL para cada um dos 3 tubos contendo 10 mL de água peptonada alcalina concentração dupla.
- f) Após a inoculação de todos os volumes da amostra (1 000, 100 e 10 mL), incubar os erlenmeyers e tubos a 35-37°C por 18 horas.
- g) A seguir, proceder de acordo com 6.6.3.2 a 6.6.7.

7 RESULTADOS

O resultado final é emitido com base nas provas bioquímicas e sorológicas.

Se o exame se limitar a pesquisa de V. cholerae 01 utilizando apenas o soro polivalente 01, relatar o resultado como: ausência ou presença de V. cholerae 01 na amostra examinada.

Se for realizada biotipagem com soros específicos, relatar o biotipo (clássico ou eltor) e o sorotipo (Ogawa, Inaba ou Hikojima) identificado.

Quando for empregada a técnica de tubos múltiplos, a densidade de V. cholerae 01 deve ser expressa como NMP de Vibrio cholerae 01 por 100 mL, o qual é obtido através de tabela específica, em que são dados os limites de confiança de 95% para cada valor do NMP determinado.

A Tabela 4 apresenta o NMP para várias combinações de resultados positivos e negativos, quando são inoculadas 3 porções de 10 mL, 3 porções de 1 mL e 3 porções de 0,1 mL da amostra. Entretanto, esta Tabela também pode ser utilizada quando volumes maiores ou menores da amostra são inoculados. Neste caso, procura-se o código formado pelo número de erlenmeyers e tubos com resultado positivo para V. cholerae obtido nas três séries consecutivas inoculadas, verificando-se o valor de NMP correspondente a ele. O NMP/100 mL será dado através da seguinte fórmula:

$$\text{NMP correspondente ao código} \times \frac{10}{\text{maior volume inoculado}}$$

Considerando-se o seguinte exemplo:

Volumes decimais inoculados	Série			Código	NMP correspondente ao código	Cálculo do NMP	NMP/100 mL
	A	B	C				
1 000 mL	+	+	+	3	93	$93 \times \frac{10}{1\ 000}$	0,93
100 mL	+	-	+	2			
10 mL	-	-	-	0			

TABELA 4 - Índice de NMP e limites de confiança de 95% para várias combinações de resultados positivos e negativos quando são utilizadas 3 porções de 10mL, 3 porções de 1 mL e 3 porções de 0,1 mL.

Nº de tubos com reação positiva de:			Índice de NMP/100 mL	95% de limite de confiança	
3 de 10 mL	3 de 1 mL	3 de 0,1 mL		Mínimo	Máximo
0	0	0	<3	-	-
0	0	1	3	<0,5	9
0	1	0	3	<0,5	13
1	0	0	4	<0,5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	1	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1 300
3	3	1	460	71	2 400
3	3	2	1 100	150	4 800
3	3	3	≥ 2 400	-	-

ANEXO A - PRESCRIÇÕES GERAISA-1 Cuidados de segurança na coleta de amostras

- a) Para o transporte dos sacos plásticos contendo as mechas, usar caixas com tampa de material apropriado, passível de ser autoclavado ou submetido a adequado processo de desinfecção no laboratório;
- b) Após a colocação das mechas nos sacos plásticos, colocá-los, individualmente, dentro de outro saco plástico autoclavável;
- c) Após o uso, o macacão de mangas compridas deve ser autoclavado antes de ser encaminhado para a lavagem.

Nota: Aventais utilizados na coleta deverão ser guardados em armários separados.

- d) Durante a colocação das mechas nos sacos plásticos, se ocorre rem respingos de esgoto na roupa de proteção do coletor, usar um desinfetante adequado (hipoclorito de sódio a 2%);
- e) Após a coleta, retirar a roupa de proteção e colocá-la em saco plástico para posterior desinfecção no laboratório;
- f) Após a retirada das luvas, desinfetar as mãos com um desinfetante adequado;
- g) Antes da remoção das luvas contaminadas pelo manuseio da mecha, o coletor não deve tocar em outras partes do corpo.

A-1.1 Materiais de segurança necessários para a coleta de amostras

- a) Capuz com visor plástico, de tecido adequado, descartável, para proteção da face contra respingos de esgoto, no momento da retirada da mecha e na colocação no saco plástico que contém o meio de transporte;
- b) Macacão de mangas compridas, de tecido de algodão ou similar, sobre o qual é colocado um avental de tecido adequado, descartável, com comprimento abaixo do joelho, para proteção da face anterior do corpo;
- c) Luvas descartáveis de cano longo, com elástico;
- d) Sapatilhas descartáveis, se necessário.

A-1.2 Solução de hipoclorito de sódio para desinfecção de aventais, luvas, máscaras, etc.

- a) Solução-estoque de hipoclorito de sódio a 10%

Fórmula:

Hipoclorito de sódio.....	10,0 mL
Água destilada.....	100,0 mL

Preparo:

Adicionar 10 mL de hipoclorito de sódio em uma proveta e completar o volume com água destilada. Armazenar em frasco escuro bem vedado por breve período de tempo.

b) Solução para desinfecção

Adicionar 1 mL da solução-estoque de hipoclorito de sódio a 10% em 100 mL de água destilada (a concentração final de cloro livre estará em torno de 4,0 mg/L).

A-2 Preparo de pílulas de vascar para o meio de IAL

A-2.1 As pílulas de vascar são utilizadas como anel vedatório entre as duas fases do meio de IAL. Para facilitar o preparo, é utilizado um sistema que consta de uma placa de acrílico de 250 mm de largura e 300 mm de comprimento perfurada com orifícios de 7 mm de diâmetro, colocada e ajustada em um suporte de madeira (ou acrílico) com três bordas elevadas servindo como base (ver Figura 9).

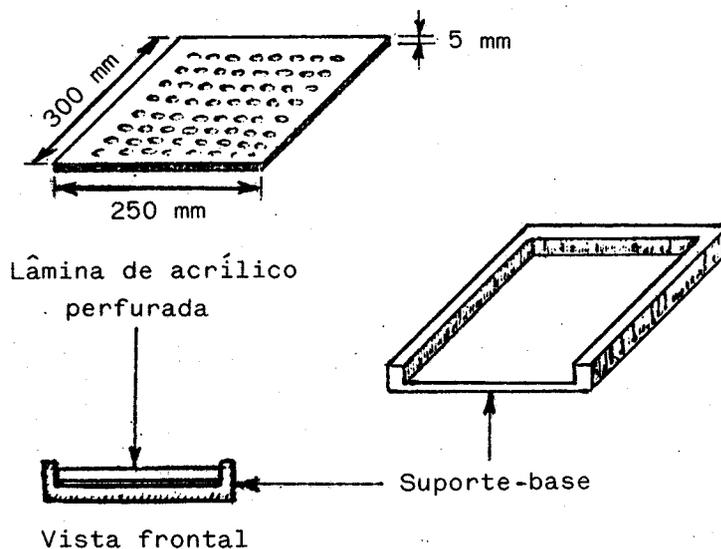


FIGURA 9

A-2.2 Técnica

Acoplar a lâmina de acrílico perfurada no suporte-base e verter a mistura de vascar fundido até o preenchimento de todos os orifícios. Retirar o excesso com espátula e colocar o sistema lâmina-suporte em geladeira ou "freezer" por 30 minutos para que ocorra solidificação total da mistura. Retirar as pílulas, agora formadas, com bastão de vidro ou barra de metal ou madeira que possua menor diâmetro que as mesmas. Colocá-las em tubos de ensaio de 12 x 120 mm antes de adicionar a fase inferior de lisina-motilidade ou conservar em geladeira até o momento de serem usadas.

A-3 Controle de esterilidade das soluções e meios de cultura

Após terem sido preparados e antes de serem usados, quaisquer soluções

ou meios de cultura devem ser testados quanto à presença de fungos ou de bactérias contaminantes.

A-4 Cuidados especiais com a vidraria

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

A-5 Lavagem e esterilização do equipamento de filtração

(Vasilhame de pressão e porta-filtro) Ver Norma CETESB M1.001.

A-6 Desinfecção do equipamento de filtração (vasilhame de pressão, porta-filtro e mangueiras)

Após a concentração da amostra, fazer passar pelo sistema de filtração 5 L de uma solução de hipoclorito de sódio a 2% de cloro livre por litro e deixar esta solução em contato durante uma hora. Esgotar então a solução de hipoclorito de sódio e fazer passar 5 L de uma solução de tiosulfato de sódio a 0,5% para neutralizar o cloro residual. A verificação desta neutralização é feita colocando-se 0,5 mL de solução de ortotoluidina (1 mg/L) em um volume de 9,5 mL da água que sai do sistema. A ausência de coloração na água indica que o cloro residual foi neutralizado. Esgotar então a solução de tiosulfato de sódio e fazer passar cerca de 5 litros de água destilada. Esgotar a água do sistema e vedar a entrada e a saída das mangueiras com folha de alumínio.

/ANEXO B

ANEXO B - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- B-1 AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Microbiological examination of water. In: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater., 17ª ed., Washington, APHA, AWWA, WPCF, 1989, Part 9000.
- B-2 BARUA, D.; & BURROWS, W. - Cholera - William B. Saunders Company. Philadelphia, 1974.
- B-3 BAUMANN, P. FURNISS, A.L. & LEE, J.V. Genus I. Vibrio. In: KRIEG, N.R. & HOLT J.G. (eds). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1, Baltimore, Williams & Wilkins, 1984, p. 518-538.
- B-4 BBL MANUAL OF PRODUCTS AND LABORATORY PROCEDURES, 5ª ed., Canada, Division of Becton, Dickinson and Company, 1973, p. 1-211.
- B-5 BIER, O.: Bacteriologia e Imunologia, 22ª ed., São Paulo, Melhoramentos, 1982, p. 535-542.
- B-6 BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO - Cólera em 1970. Ministério da Saúde - Centro de Investigações Epidemiológicas. Vol. (ANO) III, Nº 18 - semanas 35 e 36, 1971.
- B-7 BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO - A cólera e outras vibrioses. Ministério da Saúde - Fundação SESP - Divisão de Epidemiologia, Estatística e Informação. Vol. (ANO) VI, Nº 15 - semanas 29 e 30, 1974.
- B-8 BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO - La situación del colera em las Americas. Organización Panamericana de Saúde, 12 (1), 1991, 24p.
- B-9 CETESB - Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos. São Paulo, 1985 (Norma Técnica L5.215).
- B-10 _____. Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratório de microbiologia. São Paulo, 1986 (Norma Técnica M1.001).
- B-11 _____. Controle de qualidade de meios de cultura. São Paulo, 1987, (Norma Técnica L5.216).

- B-12 . Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água, São Paulo, 1988, 150 p.
- B-13 COLWEEL, R.R.; WEST, P.A.; MANEVAL, D.; REMMERS, E.F.; ELLIOT, E.L.; CARLSON N.E. Ecology of pathogenic vibrios in Chesapeake Bay. In: Colweel, R.R. (ed.) Vibrios in the environment, New York, John Wiley & Sons, 1984, p. 367-87.
- B-14 DIFCO LABORATORIES. Difco manual: dehydrated culture media and reagents for microbiology, 10 ed., Detroit, 1985, 1155 p.
- B-15 FARMER III, J.J.; HICKMANN-BRENNER, F.W. & KELLY, M.T. Vibrio. In: LENNETTE, E.H. et al (eds), Manual of Clinical Microbiology, 4ª ed., Washington D.C., American Society for Microbiology, 1985, p. 282-301.
- B-16 FEACHEM, R.G.; BRADLEY, D.J.; GARELICK, H. & MARA, D.D.: Sanitation and Disease - Health Aspects of Excreta and Wastewater Management, Chichester, John Wiley & Sons, 1983 p. 297-325.
- B-17 FELSENFELD, O. - A review of recent trends in cholerae research and control. BWHO, 34: 161 - 195, 1966.
- B-18 GUIDELINES FOR CHOLERAЕ CONTROL - Genebra, WHO, (1974-1975) notas p. 98, 123 e 222.
- B-19 HOFER, E. - Métodos de isolamento e identificação de V. cholerae. Instituto Oswaldo Cruz - Rio de Janeiro, RJ, 1974.
- B-20 MARTINS, M.T. Ecologia de Vibrio cholerae no ecossistema aquático. Tese de Livre Docência. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 1988, 222 p.
- B-21 PESSOA, G.V.A. & SILVA, E.A.M. Milieu pour l'identification présumptive rapide des enterobacterias, des aeromonas et des vibrions. Ann. Microbial. Ins. Pasteur), 215-A: 341-347, 1974.
- B-22 SMITH JR., H.L. Serotyping of non-cholera vibrios. J.Clin. Microbiol., 10: 85-90, 1979.

B-23 World Health Organization - Cholera - The epidemic in Peru Part. I.
Weekly Epidemiological Record, nº 9, 01 March 1991.

B-24 World Health Organization - Cholera - The epidemic in Peru Part.II,
Weekly Epidemiological Record, nº 10, 08 March 1991.
