

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE ANÁPOLIS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA, EXTENSÃO E
AÇÃO COMUNITÁRIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

MANUAL DE TESTES MICROBIOLÓGICOS EM
ODONTOLOGIA

Anápolis

2019

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE ANÁPOLIS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA, EXTENSÃO E
AÇÃO COMUNITÁRIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

MANUAL DE TESTES MICROBIOLÓGICOS EM
ODONTOLOGIA

Produção técnica do programa de pós-graduação da odontologia para obtenção da aprovação na disciplina de Métodos e Técnicas de Investigação Científica.

Ana Claudia Dezzen
Camila Ferro de Souza Roriz
Danielle Coelho Ribeiro Batista

Anápolis

2019

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO

FASE PRÉ-ANALÍTICA

1. Coleta das amostras.....	5
1.1 Coleta de amostras na saliva.....	5
1.2. Métodos de indução de Biofilme usados em pesquisas odontológicas.....	8
1.2.1 In situ.....	8
1.1.2 In vitro.....	8
1.1.2.1 Biofilme mono espécie de <i>Enterococcus faecalis</i>	9
1.1.2.2 Biofilme duo espécie de <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
1.1.2.3 Formação de biofilme em placas de microtitulação,.....	10
1.1.2.4 Formação do biofilme sobre corpos de prova.....	10
1.1.2.5 Formação do biofilme no interior de corpos de prova.....	11
1.3 Coleta de amostras no fluido gengival.....	12
1.3.1 Método de lavagem gengival.....	12
1.3.2 Por meio de túbulos microcapilares ou micropipetas.....	13
1.3.3 Utilização de tiras de papel filtro (periopaper).....	13
1.4 Coleta de amostra nos canais radiculares.....	13
2. Transporte das amostras.....	15
2.1 Meios para Transporte.....	16
2.1.1 Meio Stuart.....	16
2.1.2 Meio Cary-Blair.....	17
3. Recepção das amostras no laboratório e análises preliminares.....	18
FASE ANALÍTICA.....	18
4. Exame microscópico.....	19
4.1 Técnicas - Microscópio ótico.....	19
4.1.1 Microscopia de campo claro.....	20
4.1.2 Microscopia de campo escuro.....	20
4.1.3 Microscopia de contraste de fase.....	20
4.1.4 Microscopia de fluorescência.....	21

4.1.5 Microscopia Confocal de varredura a laser.....	22
4.2 Microscopia Eletrônica.....	22
4.2.1 Microscopia eletrônica de varredura.....	22
4.2.2 Microscopia eletrônica de transmissão.....	23
5. Métodos de coloração.....	24
5.1 Coloração de Gram.....	25
5.2 Método de Ziehl-Neelsen.....	26
5.3 Método de Fontana-Tribondeau.....	27
5.4 Método de Brown & Brenn.....	27
6. Processamento das Amostras.....	28
6.1. Métodos de isolamento e detecção de microorganismos.....	29
6.1.1 Meios de Cultura.....	29
6.1.2 Preparo do meio de cultura.....	31
6.1.3 Meios de cultura, composição e indicação.....	32
6.2 Técnicas de Semeadura.....	52
6.2.1 Semeadura em meios sólidos.....	52
6.2.2 Semeadura em meios líquidos.....	53
7. Métodos de quantificação de microorganismos.....	53
7.1 Medidas Diretas.....	53
7.1.1 Contagem em placas (Unidades Formadoras de Colônias – UFC).....	53
7.1.2 Contagem microscópica direta.....	56
7.2 Medidas Indiretas.....	57
7.2.1 Turbidimetria.....	57
7.3 Testes Colorimétricos.....	58
7.3.1 Cristal violeta.....	58
7.3.2 Teste da Resazurina.....	59
7.3.3 Teste XTT.....	59
7.3.4 Ensaio de Biotimer.....	60
8. Métodos de identificação de microorganismos.....	60
8.1 Série Bioquímica.....	61
8.2 Análise por imagem.....	62
8.2.1 Microscopia Confocal a Laser.....	63
8.2.2 Microscopia eletrônica de varredura.....	65

9. Testes Antimicrobianos de substâncias odontológicas.....	66
9.1. – Métodos qualitativos.....	66
9.1.1 Técnica Antibiograma – Teste de difusão em disco.....	66
9.1.2 Teste Ágar diluição.....	67
9.2 Métodos quantitativos.....	68
9.2.1 Macrodiluição em caldo.....	68
9.2.2 Microdiluição em caldo.....	69
Referências.....	71

INTRODUÇÃO

A cavidade oral é habitada por diversos microrganismos, entre bactérias, vírus e fungos. Até o momento, já foram identificadas 770 espécies bacterianas e muitas delas são específicas dessa região. Dentro da cavidade oral, existem ainda diversos micro habitats, como a superfície dental, a saliva, a mucosa epitelial, sulco gengival, língua, palatos duro e mole, amígdalas, e cada um deles são colonizados de diferentes maneiras, por diferentes espécies. (the human oral microbiome)

Outra particularidade do microbioma oral, é o agrupamento em forma de biofilme dos microrganismos. Esses biofilmes são organizações complexas e bem estruturadas de microrganismos, imersos em uma matriz de polissacarídeos extracelular, o que proporciona maior resistência às alterações ambientais, além de maior resistência a antimicrobianos e manutenção metabólica mesmo em períodos de escassez de nutrientes. (estrela e oral microbiota dynamics)

Quando em disbiose, ou seja, em desequilíbrio, por fatores diversos, esses microrganismos provocam doenças bucais, como a cárie, a gengivite e a periodontite, além de infecções fúngicas e virais. Além disso, existem ainda fortes relações entre os microrganismos da cavidade oral e doenças sistêmicas, como problemas cardiovasculares, acidente vascular cerebral (AVC), diabetes, artrite reumatoide, parto prematuro, e até doença de Alzheimer (human oral microbiome)

Os testes microbiológicos em odontologia têm como finalidade a identificação e caracterização de microrganismos nas infecções da cavidade bucal, bem como a maneira como interagem entre eles, bem como a análise da efetividade antimicrobiana de materiais odontológicos.

Vários fatores podem influenciar o estudo destes microrganismos, como por exemplo a coleta, o transporte, os meios de cultura, a identificação e a suscetibilidade antimicrobiana. Assim, faz-se necessário o conhecimento específico, a seleção de protocolo e a adequação de técnicas microbiológicas em relação aos microrganismos e processamento das amostras. Para tanto, é de extrema importância o planejamento, definição e detalhamento das etapas e procedimentos em testes microbiológicos.

O objetivo deste manual são explicitar, de forma clara e objetiva, os testes microbiológicos para análises de efetividade antimicrobiana de materiais odontológicos, identificar as técnicas empregadas para a identificação de

microrganismos nas infecções da cavidade bucal, discutir a formação do biofilme na cavidade bucal e reconhecer os métodos para avaliação de biofilmes.

FASE PRÉ-ANALÍTICA

1. Coleta das amostras

A coleta das amostras é um passo fundamental para a obtenção de um correto resultado diagnóstico.

Envolve os seguintes princípios:

- O material deve ser coletado no sítio infeccioso com o mínimo de contaminação pelos tecidos adjacentes.
- A amostra deve ser coletada no melhor tempo para cada agente infeccioso, considerando a sua evolução natural.
- Deve-se obter uma quantidade adequada da amostra.
- Deve-se usar recipientes, materiais e meios de cultura adequados
- Quando possível, obter as amostras antes da administração de antibióticos
- Deve-se identificar corretamente os recipientes de coleta

1.1 Coleta de amostras na saliva

Amostras de saliva são amplamente empregadas nos estudos sobre cárie dentária, doença periodontal, xerostomia, doenças inflamatórias e tumorais das glândulas salivares. Podem ser obtidas por estimulação ou não.

A estimulação da produção de saliva pode ser feita de forma mecânica (goma de mascar, parafina, látex) ou química (ácido cítrico), sendo que a quantidade de saliva produzida é afetada, de acordo com a intensidade e tempo de duração do estímulo, podendo alguns de seus constituintes serem alterados. (glândula parótida). E quando sem estímulo exógeno, o fluxo salivar é alterado por estímulo olfatório, exposição à luminosidade, posição do corpo e ciclo circadiano (glândula submandibular).

Passo a passo da coleta em saliva (fig.3)

- Realizar a coleta antes de escovar os dentes, comer ou beber por no (mínimo 2h).
- Não fazer uso de nenhum medicamento (oral, transdérmico ou injetável) antes da primeira coleta (manhã).
- **1 amostra:** coletar a amostra entre 8 e 9 horas.
- **3 amostras:** cole/tar a amostra da manhã (8/9h), a amostra da tarde (16/17h), a amostra da noite (22/23h).
- **4 amostras:** coletar a 1ª amostra pela manhã, ao despertar enquanto o paciente ainda estiver deitado.

*Observar para a coleta da manhã não ultrapassar 1h após o levantar, exceto quando orientado pelo profissional de saúde.

- Abra o kit de coleta (fig.1 e 2), pegue um dos rolos de algodão.
- Coloque o rolo de algodão dental abaixo da língua.
- Marque no relógio, ou cronômetro, no mínimo 3 minutos.
- Procure umedecer o algodão o máximo que puder.
- Abra a embalagem da seringa que acompanha o kit. Retire o embolo da seringa.
- Passado o tempo, tire o rolo de algodão da boca e coloque na seringa, já sem o embolo.
- Abra o tubo correspondente ao horário da coleta e posicione a seringa na boca do tubo.
- Recoloque o embolo na seringa e comprima o algodão até a retirada total da saliva.
- Tampe o frasco e identifique com seu nome, data e horário da coleta. • Verifique se o volume coletado atinge a marca de 1mL, volume necessário para a realização dos exames. • *Envio imediato ao laboratório, ou caso não sendo possível, armazenar o material coletado em geladeira (8 a 10°C)

Tubos para coleta

Material em polipropileno.



Cada kit contém:

- 3 tubos
- 3 seringas sem agulha
- 3 rolos de algodão dental

Fig. 1 Kit de Coleta. Fonte: *Labvitrus*

Kit de Coleta de Saliva - Salivit - Passo-a-passo



Detalhes do verso



Instruções para coleta e armazenamento das amostras de saliva.

Fig. 2 – Kit de Coleta. Fonte: *Labvitrus*



Fonte: *Salivette®*



Fig.3 – Passo a passo da coleta em saliva, Fonte: *Salivette®*

1.2. Métodos de indução de Biofilme usados em pesquisas odontológicas

Os microrganismos não vivem em colônias isoladas da mesma espécie. Normalmente são agrupados em estruturas complexas chamadas biofilmes.

As estratégias de controle de biofilme são importantes, pois mais de 80% das doenças infecciosas que acometem os seres humanos estão relacionadas com a presença complexa organização. Além disso, os microrganismos organizados em um biofilme podem ser 1.000 vezes mais resistentes aos microbicidas.

1.2.1 In situ

- Para a formação do biofilme oral, um voluntário deve ter seu arco superior moldado, e com a obtenção do modelo, sobre ele deve ser confeccionada uma placa ortodôntica removível tipo Hawley.
- Confeccção de 6 nichos dispostos em duas fileiras (10x6x3mm) na placa ortodôntica.
- Colocação dos blocos de dentina bovina previamente preparados sobre os nichos e fixação destes blocos com cera utilidade
- O voluntário deve utilizar o referido dispositivo intraoral durante três dias para possibilitar a formação de biofilme sobre a superfície dos blocos de dentina, sem contudo interromper seus procedimentos de higiene.(fig. 21)



Fig. 21. Marco Antonio Hungaro Duarte Flaviana Bombarda de Andrade Sergio P. Marcondes Cyntia Estrela Carlos Estrela In: Estrela, Carlos. Metodologia Científica: Ciência, Ensino, Pesquisa (p 549)

1.1.2 In vitro

1.1.2.1 Biofilme mono espécie de *Enterococcus faecalis*

- Condições assépticas em uma câmara de fluxo laminar.
- Uma cepa padrão de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212 ou ATCC 4083) deve ser usada para a formação de biofilme.
- Confirmação da pureza da cepa pela coloração de Gram e morfologia celular
- Cultivar as células em 4 mL de caldo de infusão (BHI) esterilizado de cérebro-coração durante a noite a 37 °C em aerobiose.
- A densidade de células a ser empregada deve ser de 3×10^8 unidades formadoras de colônia por mililitro.
- Todas as amostras de substratos de dentina deverão ter uma das superfícies identificadas.
- A superfície marcada deverá ser colocada em direção à superfície da placa, e o outro lado será usado para o crescimento do biofilme.
- As amostras de substrato devem ser colocadas em placas de 24 poços de cultura.
- Cada poço deverá conter 1,8 mL de BHI esterilizado e 0,2 mL do inóculo no meio, onde as amostras (blocos ou cilindros de dentina) serão mantidas submersas.
- As placas de cultura devem ser colocadas em uma estufa a 37°C por 14 dias sob agitação.
- Para evitar a deficiência de nutrientes, o meio de cultura BHI deverá ser completamente substituído a cada 48 horas, sem a adição de novos microrganismos.²¹

1.1.2.2 Biofilme duo espécie de *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*

- Para o biofilme duo espécie, os mesmos procedimentos descritos anteriormente para o *Enterococcus faecalis* devem ser utilizados, para cada espécie em períodos diferentes para evitar a contaminação.
- Após a incubação, a densidade bacteriana deve ser ajustada em 10⁹ células/mL para o *E. faecalis* (ATCC 29212 ou ATCC 4083) e 10⁷ células/mL para a *P. aeruginosa*, empregando para esse ajuste um espectrofotômetro em uma densidade ótica de 1 a 600 nanômetros (padrão 0,5 de MacFarland).
- Os blocos ou cilindros de dentina devem ser colocados em poços. 100 µL de *E. faecalis* acrescidos de 100 µL de *P. aeruginosa* e 1500 µL de BHI devem ser colocados nos poços onde estão os espécimes de dentina, conforme descrito por van der Waal e colaboradores.²³
- Para o crescimento de ambos os biofilmes, as placas devem ser incubadas aerobicamente a 37 °C por quatro dias.
- O BHI deve ser renovado a cada 48 horas.

1.1.2.3 Formação de biofilme em placas de microtitulação

- Placa de microtitulação é utilizada como substrato para a adesão e formação do biofilme in vitro.
- O microrganismo de interesse no estudo deve ser crescido de acordo com as condições fisiológicas necessárias, distribuído nos poços da placa de microtitulação e incubado por tempo e temperatura adequados, por um período correspondente à fase de adesão inicial do microrganismo aos poços.
- Em seguida, a suspensão microbiana deve ser removida, e cada poço deve ser lavado para permitir que apenas as bactérias pré-aderidas cresçam e formem o biofilme.

1.1.2.4 Formação do biofilme sobre corpos de prova

- Posicionar os corpos de prova no fundo dos poços da placa de microtitulação, atuando como o substrato no qual será formado o biofilme.
- Esses corpos de prova podem ser constituídos por vários materiais, como, por exemplo, resinas, silicones, acetatos, metais e estruturas que se assemelham àquelas

encontradas nos seres humanos como esmalte e dentina, aproximando o estudo das condições encontradas in vivo.

- Para a formação do biofilme os corpos de prova distribuídos nos poços da placa de microtitulação podem ser recobertos, por exemplo, com saliva humana ou artificial, para formação da película que estimule a adesão.
- Então, a suspensão microbiana de interesse deverá ser adicionada sobre os corpos de prova e as placas incubadas, de acordo com as condições fisiológicas dos microrganismos, para que haja o crescimento do biofilme.

1.1.2.5 Formação do biofilme no interior de corpos de prova

- Quando são utilizados no estudo corpos de prova que apresentem estrutura porosa ou tubular, como a dentina, cujo interesse é a avaliação no interior dessa estrutura, pode-se optar pela secção da amostra, de forma a expor a área de interesse, como, por exemplo, os túbulos dentinários, de modo a facilitar a penetração microbiana no interior da amostra.
- Em seguida, pode ser utilizada a metodologia de fixação dos corpos de prova no interior de tubos falcon, deixando-se livre apenas a superfície que receberá a infecção microbiana e tratamento.



Fig. . Posição dos corpos de prova no interior de tubo falcon.. Estrela, Carlos. Metodologia Científica: Ciência, Ensino, Pesquisa (Página 563). . Edição do Kindle. Fonte: Denise M. Palomari Spolidorio Renata Serignoli Francisconi Patricia Milagros Maquera Huacho Caroline Coradi Tonon Ester Alves Ferreira Bordini Luís Carlos Spolidorio. In:Estrela, Carlos. Metodologia Científica: Ciência, Ensino, Pesquisa (Página 561

- Adicionar um volume suficiente da suspensão microbiana para recobrir as amostras que estão no interior dos tubos e levar em centrífuga por diferentes ciclos de

centrifugação (3.000, 4.000 e 5.000 rpm), com duração de 5 minutos para cada ciclo.

- A cada novo ciclo é importante a remoção da suspensão microbiana que está dentro do tubo para a colocação de nova suspensão, de forma que mais células viáveis possam estar presentes no interior dos corpos de prova.
- Após os ciclos de centrifugação, as amostras devem ser incubadas, a fim de permitir a recuperação bacteriana e a formação do biofilme no interior da estrutura de interesse.

O biofilme é uma comunidade complexa e muito bem estruturada de microrganismos, atados uns aos outros sobre uma superfície sólida (dente). Pode ser benéfico, oferecendo uma barreira protetora contra os microrganismos nocivos e a ação antibiótica, mas em alguns casos, quando em excesso, prejudica a microbiota oral, tornando-se meio ideal para proliferação de bactérias danosas às estruturas dentais.

Logo, o controle efetivo do biofilme é imprescindível, e o produto ideal para a higiene deve ser de fácil manuseio, efetivo na remoção dos depósitos orgânicos, inorgânicos e manchas, bactericida, fungicida e não tóxico.

1.3 Coleta de amostras no fluido gengival

Há várias maneiras de coletar amostras no fluido gengival, dentre elas, destacam-se:

1.3.1 Método de lavagem gengival

- Irrigação do sulco gengival com solução isotônica (solução de Hank's).
- Coleta do fluido (diluição do fluido sucular contendo células constituintes solúveis).



Fig. 5. Fonte: *Tomitsuka, 2016*.

1.3.2 Por meio de túbulos microcapilares ou micropipetas

- Isolamento e secagem do local selecionado.
- Inserção de túbulos capilares de diâmetros conhecidos no sulco gengival.
- Com este método é possível calcular o volume coletado.

1.3.3 Utilização de tiras de papel filtro (periopaper)

- Tiras do papel filtro são inseridas no sulco gengival ou bolsa periodontal (fig.5)
- Coleta pode ser feita por um período específico ou indeterminado.
- Técnica rápida, fácil e atraumática.
- Coleta feita com pontas de papel absorvente esterilizadas, seguido a colocação destas em meio para transporte ou de cultura adequado. As amostras também podem ser coletadas com explorador, alargador, lima ou outro instrumental esterilizado.

1.4 Coleta de amostra nos canais radiculares

Alguns princípios devem observados na coleta das amostras: utilização de técnicas assépticas, remoção de contaminantes coronários, isolamento absoluto, desinfecção do campo operatório, fácil acesso para a coleta das amostras e evitar contaminação química do espaço pulpar. (Gomes, BPPA. In: Estrela, C. Metodologia Científica 3ªed. pag 571).

Passo a passo:

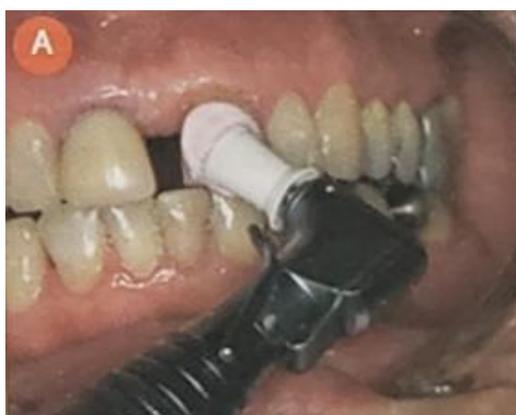


Fig. 6 - Polimento coronário com pedra pomes.

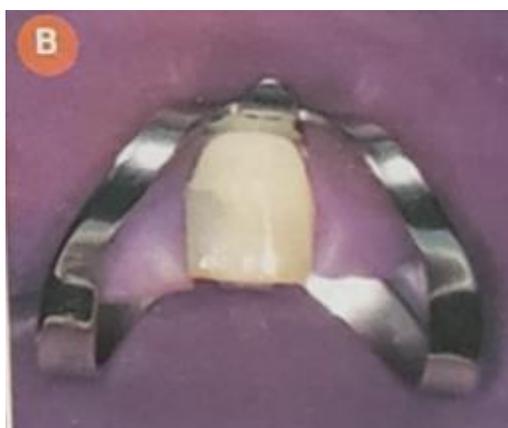


Fig. 7 - Isolamento absoluto prévio do elemento dental.



Fig. 8- Descontaminação do campo operatório (dente, grampo e lençol).

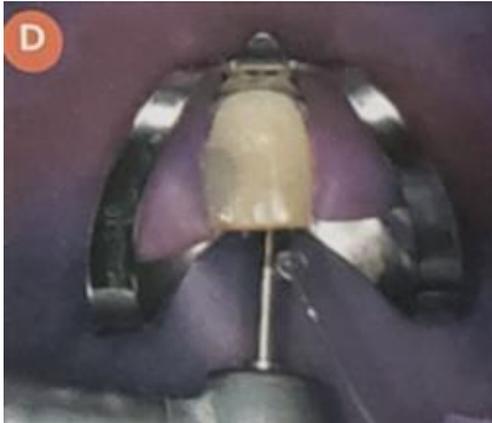


Fig. 9 - Acesso coronário associado à irrigação com solução salina estéril.



Fig. 10 - Acesso coronário realizado sem evidência de interferências.



Fig.

11 – Inserção do cone absorvente estéril/apirogênico para coleta do conteúdo endodôntico ficando 1 minuto no canal radicular.

Fonte: Gomes, BPFA. In: Estrela, C. Metodologia Científica 3ªed. pag 579

2. Transporte das amostras

O objetivo principal do transporte das amostras é mantê-las o mais próximo possível ao seu estado original.

- Deve-se evitar condições extremas de temperatura, variações de pressão e a falta de umidade.

- Para períodos mais longos (mais de 4 dias), entre a coleta e análise da amostra, esta deve ser congelada a -70°C .
- Deve-se evitar frascos de vidro, para evitar acidentes durante o transporte.

2.1 Meios para Transporte

São soluções tamponadas, sem fatores de crescimento, desenvolvidas para manter a viabilidade dos microorganismos, porém sem permitir a multiplicação.

2.1.1 Meio Stuart

Conservação de microorganismos patogênicos como: *Haemophilus* spp., *Pneumococcus*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. entre outros. Recomendado para o transporte de materiais biológicos contendo bactérias, fungos e protozoários.

Não tem nitrogênio na composição, o que impede consideravelmente a multiplicação de microorganismos e a composição nutritiva garante a sobrevivência deles.

Composição básica:

Tioglicolato de sódio

Glicerofosfato de sódio

Cloreto de cálcio

Azul de metileno

Ágar

Água destilada

Procedimentos de preparo

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Fundir completamente;
- Distribuir 7 ml por tubo; Mod IV - 4
- Esterilizar em autoclave; *f* Após retirar da autoclave, manter os tubos em posição vertical para que solidifiquem.

- pH: 7,4 +/- 0,2
- Conservar embalado de 4 a 8°C por 1 a 2 semanas.

Inoculação da amostra no meio:

- O material biológico deve ser coletado com auxílio de um *swab* estéril com haste de madeira;
- Após a coleta, introduzir imediatamente o *swab* no meio de cultura e quebrar a ponta da haste, de modo que a parte que contém o algodão fique no meio de cultura;
- Fechar o tubo;
- Manter em temperatura ambiente até o momento de semear nos meios seletivos adequados.

Não deixar o meio com a tampa aberta ou semi-aberta após a sementeira.

Interpretação:

Cor original do meio: Branco opalescente. Como este é um meio de transporte, não há evidência de crescimento bacteriano.

2.1.2 Meio Cary-Blair

Meio para transporte e conservação de materiais biológicos contendo bactérias, principalmente gram negativas.

O meio de Cary Blair foi formulado à partir do meio de Stuart, uma vez que microrganismos patogênicos e outros coliformes fecais sobrevivem bem neste meio. O que difere este meio do meio de Stuart, é a adição de uma solução salina balanceada de tampão fosfato inorgânico e omitindo da fórmula o azul de metileno.

Composição básica:

Cloreto de sódio

Fosfato de sódio

Tioglicolato de sódio

Glicerofosfato de sódio

Cloreto de cálcio

Ágar

Água destilada

Procedimento de preparo

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Fundir completamente;
- Distribuir 7 ml por tubo;
- Esterilizar em autoclave;
- Após retirar da autoclave, manter os tubos em posição vertical para solidificar.
- pH: 7,4 +/- 0,2.
- Inoculação da amostra no meio:
 - Introduzir um *swab* estéril na amostra desejada;
 - Após a coleta, introduzir imediatamente o *swab* no meio de cultura e quebrar a ponta da haste, de modo que a parte que contém o algodão fique no meio de cultura;
 - Fechar o tubo;
 - Manter em temperatura ambiente até o momento de semear nos meios seletivos adequados.

3. Recepção das amostras no laboratório e análises preliminares

- A recepção da amostra deve ser feita em uma cabine especial, com profissionais usando equipamentos de proteção individual (EPI) completos.
- Verificar as informações das amostras, no formulário de solicitação
- Se faltarem informações, deve-se solicitar uma nova amostra
- caso não seja possível coletar uma nova amostra, deve-se informar em um relatório sobre a inadequação da amostra.

Todas as amostras recebidas em laboratório devem ser avaliadas das seguintes maneiras:

- Macroscopicamente: observar o aspecto visual, qualidade, quantidade, odor.
- Microscopicamente: confirmar a qualidade da amostra, fornecer informações sobre os tipos de microrganismos presentes (bactérias, fungos, protozoários, vírus), sugerir magnitude da resposta inflamatória.

FASE ANALÍTICA

4. Exame microscópico

A principal função do microscópio é tornar visível o que o olho não vê. Na microbiologia, é utilizado para duas funções básicas: a detecção inicial e a identificação dos microrganismos.

O exame microscópico de amostras clínicas é usado para detectar células bacterianas, elementos fúngicos, parasitas (ovos, larvas ou formas adultas), e inclusões virais presentes em células infectadas. Propriedades morfológicas características podem ser utilizadas para a identificação preliminar da maioria das bactérias e são utilizadas para a identificação definitiva de muitos fungos e parasitas. A detecção microscópica de organismos corados com anticorpos marcados com corantes fluorescentes ou outros marcadores tem sido muito útil para a identificação específica de muitos organismos. São utilizados cinco métodos gerais de microscopia

Ao exame microscópico, observa-se:

- A quantidade de neutrófilos, que indicam a magnitude da resposta inflamatória.
- A presença de bactérias, fungos e parasitas.
- Avaliar a presença de bactérias anaeróbicas.

Embora algumas bactérias e microrganismos possam ser observados em microscópio de campo claro, muitas amostras devem ser coradas e analisadas em outro método microscópico.

4.1 Técnicas - Microscópio ótico

4.1.1 Microscopia de campo claro

Utiliza luz visível como fonte de iluminação. A amostra aparece com um fundo claro. Usado para analisar amostras coradas e contar microrganismos.

- Condensador para focar a luz sobre a amostra.

- Dois sistemas de lentes - objetivas (10x, 40x, 100x) e oculares (10 a 15x) – ampliar as imagens.
- Limitação: resolução da imagem.

4.1.2 Microscopia de campo escuro

A amostra iluminada obliquamente por um condensador de luz especial, de modo que a luz não entra diretamente na objetiva do microscópio. Como não há luz de fundo direta, os microrganismos brilham quando atingidos pela luz, contra um campo escuro.

Usado para visualizar microrganismos vivos que não podem ser corados, suspensos em líquido. Os microrganismos brilham quando atingidos pela luz, contra um campo escuro.

Limitação: dificuldade de analisar estruturas internas dos microrganismos, já que a luz passa mais em torno do microrganismo do que através dele.

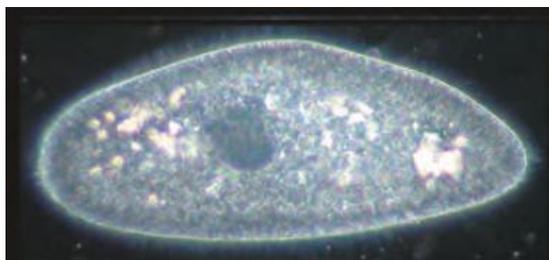


Fig. Microscopia de campo escuro Fonte: Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia. 10. ed.

4.1.3 Microscopia de contraste de fase

Utilizado para definir estruturas detalhadas de microrganismos não corados e não fixados. Em um microscópio de contraste de fase, um conjunto de raios luminosos sai diretamente da fonte de luz e outro conjunto é derivado da luz que é refletida ou difratada de uma estrutura particular na amostra. Quando os dois conjuntos de raios de luz se juntam, formam uma imagem da amostra na lente ocular, contendo áreas claras (em fase) e vários tons de cinza. Utilizado para visualizar estruturas internas das amostras vivas.



Fig. . Microscopia de Contraste de fase. Fonte: Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia. 10. ed.

4.1.4 Microscopia de fluorescência

Baseia-se no princípio de fluorescência que alguns organismos tem naturalmente. Quando os microrganismos não fluorescem naturalmente, é adicionado um fluorocromo. Utiliza uma fonte de luz ultravioleta, que leva a emissão de luz de compostos fluorescentes. Indicado para detectar rapidamente os microrganismos em tecidos e amostras vivas.

- Usada para análise de amostras coradas com fluoróforo, que absorvem UV, e emite energia.
- Possui lâmpada especial (mercúrio de alta pressão) e série de filtros.
- Estrutura aparecem brilhantes

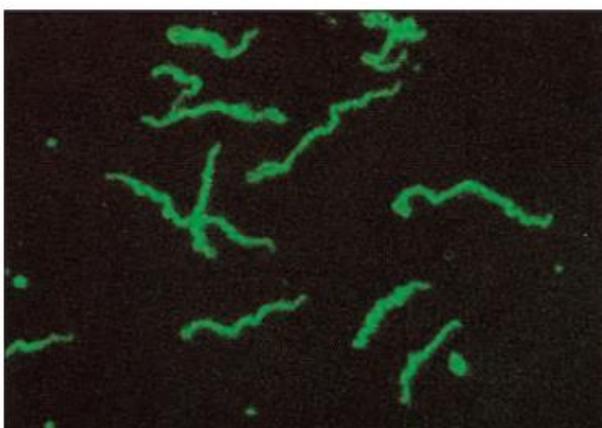


Fig. . Microscopia de Fluorescência. Fonte: Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia. 10. ed.

4.1.5 Microscopia Confocal de varredura a laser

As amostras são coradas com fluorocromos. Ilumina-se uma pequena região da amostra com uma luz com pequeno comprimento de onda. Como resultado, são obtidas imagens tridimensionais. Usado em endodontia, histologia e microbiologia – caracterização de biofilme e infecção intradentária e testes de eficiência de substâncias sobre o biofilme.

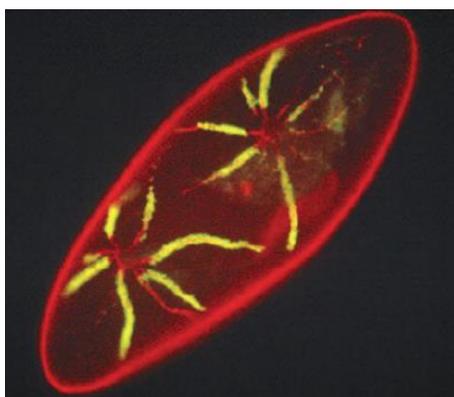


Fig. . Microscopia Confocal. Fonte:
Tortora GJ, Funke BR, Case CL.
Microbiologia. 10. ed.

4.2 Microscopia Eletrônica

4.2.1 Microscopia eletrônica de varredura

Utiliza um feixe de elétrons ao invés de luz; os elétrons são refletidos a partir do espécime; devido ao comprimento de onda mais curto dos elétrons, estruturas menores que $0,2 \mu\text{m}$ podem ser determinadas. A imagem produzida é tridimensional.

- Diferente das demais, utiliza espirais magnéticas em vez de lentes.
- Feixe de elétrons.
- Melhor resolução da imagem que é direcionada à tela do computador.
- Microscópios eletrônicos de transmissão (luz atravessa a amostra).
- Microscópios eletrônicos de varredura (imagem 3D).



Fig. . Microscópio Eletrônico de Varredura. Fonte: Zeiss®

4.2.2 Microscopia eletrônica de transmissão

Utiliza um feixe de elétrons ao invés de luz; os elétrons passam através da amostra; devido ao comprimento de onda mais curto dos elétrons, estruturas menores que $0,2 \mu\text{m}$ podem ser determinadas. A imagem produzida é bidimensional. Indicado para examinar vírus e estruturas internas das células.



Fig. . Microscópio Eletrônico de Transmissão. Fonte: Zeiss®

5. Métodos de coloração

5.1 Coloração de Gram

Permite observar a forma e o tipo de agrupamento bacteriano e diferenciar as células em dois grupos (positivos e negativos). Mecanismo baseado na composição da parede celular.

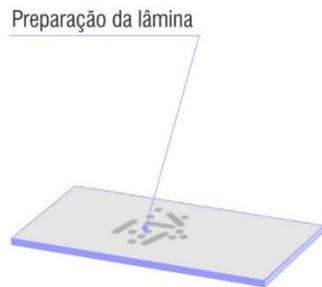
Bactérias Gram positivas: camada espessa de polipeptideoglicano, coradas pelo lugol (cor violeta).

Bactérias Gram negativas: camada delgada de polipeptideoglicano e lipopolissacarídeos, coradas pela fucsina (cor vermelha).

Passo a passo

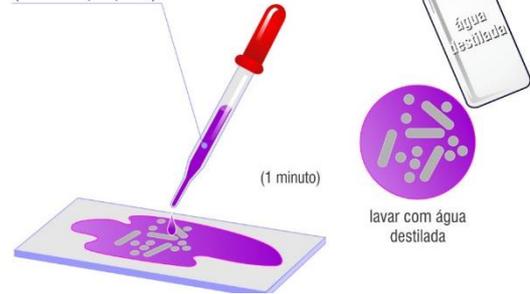
- Lâminas limpas, desengorduradas e secas. Esfregaços finos, secos ao ar ou calor, ocupando espaço na lâmina (3/4 para diagnóstico)
- Cobrir os esfregaços com solução aquosa de cristal violeta de genciana por 1 min.
- Retirar o excesso ou lavar rapidamente com água destilada.
- Cobrir os esfregaços com lugol (iodo). Deixar 1 min.
- Descorar rapidamente com álcool-acetona. Lavar com água destilada em abundância.
- Corar com solução aquosa (diluída) de fucsina ou safranina, cobrindo os esfregaços com corante por 30 segundos.
- Lavar, secar ao ar e levar ao microscópio ótico para visualização.

1. Coloração de Gram



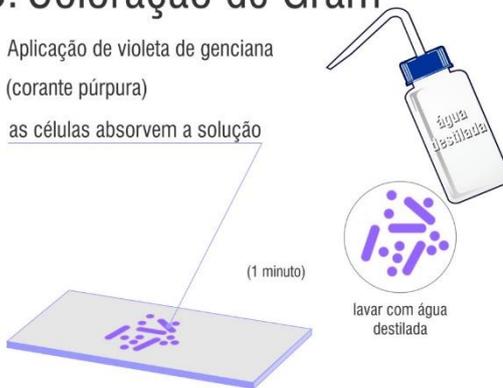
2. Coloração de Gram

Aplicação de violeta de genciana
(corante púrpura)



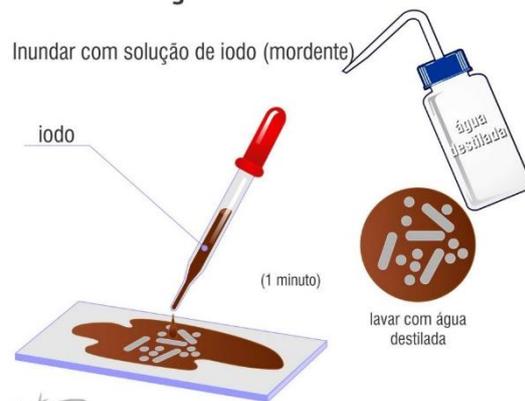
3. Coloração de Gram

Aplicação de violeta de genciana
(corante púrpura)
as células absorvem a solução



4. Coloração de Gram

Inundar com solução de iodo (mordente)



5. Coloração de Gram

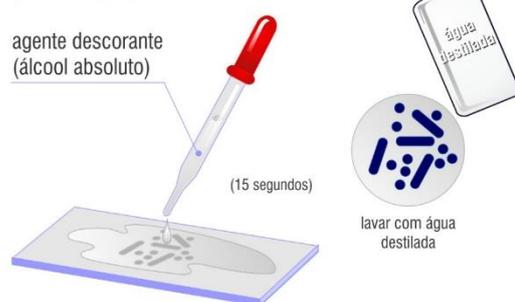
Solução de iodo (mordente)
as células ficam azul escuras



6. Coloração de Gram

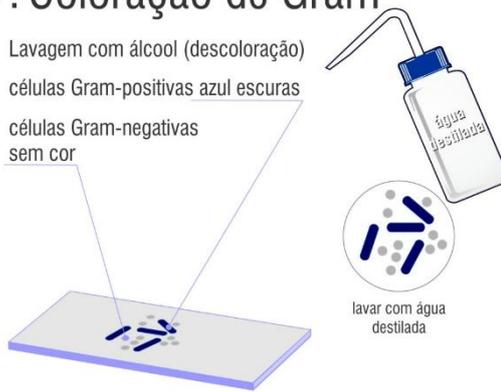
Lavar com agente descolorante
(descoloração)

agente descolorante
(álcool absoluto)



7. Coloração de Gram

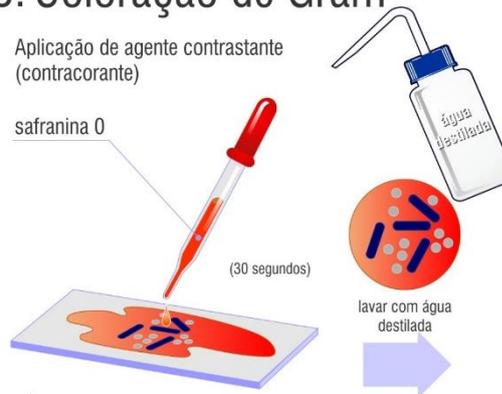
Lavagem com álcool (descoloração)
células Gram-positivas azul escuras
células Gram-negativas sem cor



8. Coloração de Gram

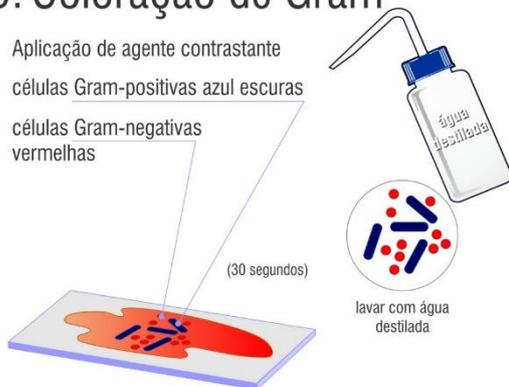
Aplicação de agente contrastante
(contracorante)

safranina 0



9. Coloração de Gram

Aplicação de agente contrastante
células Gram-positivas azul escuras
células Gram-negativas vermelhas



10. Coloração de Gram

Observar no
microscópio

- células Gram-positivas azul escuras
- células Gram-negativas vermelhas

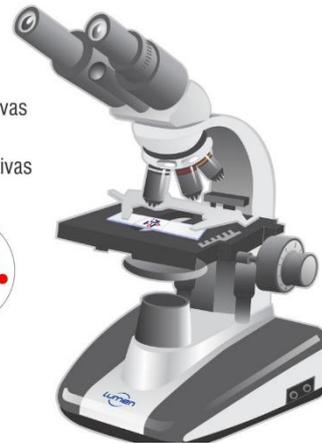


Fig. 12 Fonte: <http://www.vidrariadelaboratorio.com.br/coloracao-de-gram-passo-passo/>

5.2 Método de Ziehl-Neelsen

Empregado para bacilos álcool-ácidos resistentes Este método de coloração é usualmente empregado na rotina laboratorial.

Passo a passo:

- Confeccionar o esfregaço em uma lâmina, deixar secar ao ar e fixá-lo pelo calor.
- Cobrir o esfregaço com fucsina de Ziehl, aquecendo até emissão de vapores por 3 a 5 minutos.
- Lavar em água corrente.
- Descorar com solução de álcool-ácido.

- Lavar em água corrente.
- Cobrir com solução de azul de metileno – 1 a 3 minutos.
- Lavar com água corrente.
- Secar e examinar ao microscópio – bacilos álcool-ácido resistentes aparecem corados em vermelho e demais estrutura em azul.

5.3 Método de Fontana-Tribondeau

Melhor processo para evidenciação de bactérias espiraladas (*Treponema*, *Borrelia*, *Leptospira*). A melhor visualização destas bactérias é através da microscopia de campo escuro. Neste processo há a precipitação da prata que se deposita na parede da bactéria. Apresentam-se na coloração marrom-escuro ou negra, sobre fundo amarelo-castanho ou marrom-claro.

Passo a passo:

- Confeccionar o esfregaço em uma lâmina limpa e deixar secar ao ar.
- Fixar o esfregaço cobrindo-o por 3 a 5 minutos, com ácido acético a 10% ou por 1 a 3 minutos com o líquido de Ruge.
- Lavar com água destilada.
- Cobrir com solução tanino (mordente) e aquecer até emissão de vapores – 30 segundos.
- Lavar cuidadosamente com água destilada – 30 segundos.
- Cobrir com solução de nitrato de prata e aquecer até a emissão de vapores – 20 a 30 segundos.
- Secar e examinar ao microscópio.

5.4 Método de Brown & Brenn

Este método consiste na coloração de bactérias Gram positivas e Gram negativas através de secções preparadas em parafina, porém compromete a capacidade de coloração, devido à ausência de evidenciação de bactérias Gram negativas, o que dificulta a interpretação dos resultados.

Foi constatado que as substâncias usadas para desmineralização alteram a coloração das bactérias.

Passo a passo:

- Proceder à coloração, desparafinização e hidratação dos cortes.
- Corar com Hematoxilina de Harris por 5 minutos.
- Passar no diferenciador por 1 minuto, lavar em água corrente por 5 minutos.
- Secar as bordas da lâmina com papel filtro, evitando ressecar o corte, e corar com cristal violeta a 1%.
- Escorrer o excesso de corante e cobrir os cortes com lugol (iodo de Grama a 1%) por 1 minuto.
- Escorrer o excesso da solução, diferenciar os cortes com éter+acetona até não ter mais corante.
- Lavar as lâminas rapidamente em água destilada e secar os cortes com papel filtro.
- Corar com solução de 1mL de fucsina básica e água destilada, 10mL, por 3 minutos.
- Escorrer o excesso do corante, lavar rapidamente com água destilada e secar as lâminas sem secar os cortes.
- Diferenciar na solução de Galeno (formaldeído 1mL, ácido acético 0,5mL, água destilada 50mL) por 3 minutos.
- Diferenciar na solução de Galeno (formaldeído 1mL, ácido acético 0,5mL, água destilada 50mL) por 3 minutos.
- Lavar as lâminas em água destilada e secá-las sem secar os cortes. Mergulhar em seguida, em acetona por 10 segundos a 1 minuto.
- Diferenciar em ácido pícrico+acetona até que o tecido tome coloração róseo amarelada por 10segundos (remover maior parte de fucsina).
- Imergir 3x em acetona pura sob leve agitação, para remoção completa do ácido pícrico.
- Lavar em mistura partes iguais acetona+xilol por 15segundos.
- Clarear em xilol – 10 banhos
- Montar lâminas.

6. Processamento das Amostras

6.1. Métodos de isolamento e detecção de microorganismos

Para o estudo dos microorganismos, deve-se obter uma cultura pura a partir de uma cultura mista. Para isso, é necessário o isolamento dos microorganismos que é obtido através da semeadura em meios de cultura sólidos em placas de petri que permitem a formação de colônias. Os meios de cultura devem ser estéreis, o que deve ser obtido através da técnica asséptica de inoculação.

6.1.1 Meios de Cultura

O material nutriente preparado para o crescimento de microorganismos em um laboratório é chamado de meio de cultura.

Permite a caracterização de microrganismo específico tanto na saúde quanto na doença.

Deve conter nutrientes necessários para favorecer o desenvolvimento microbiano e fatores que influenciam o crescimento (fonte de carbono, nitrogênio, sais inorgânicos, vitaminas, etc)

As exigências nutritivas da célula microbianas requerem condições indispensáveis como: pH, pressão osmótica, umidade e temperatura adequada à incubação.

Os componentes adicionados com mais frequência: peptonas (proteínas com função de suprir o nitrogênio do meio de cultura como bactopectona, proteose peptona, a triptose, bacto-triptose, neo-proteose peptona); os aminoácidos; o extrato de carne, outra fonte de nitrogênio para os microorganismos que também fornecem alguns constituintes minerais como sódio, cloro e potássio; o extrato de leveduras, uma boa fonte de vitaminas; o sangue, que além de fonte de nitrogênio, também é fonte de carboidratos e algumas vitaminas, e os açúcares que servem de fontes de carbono.

Classificação dos meios de cultura:

Quanto à consistência:

- Meios líquidos: os nutrientes estão dissolvidos em uma solução aquosa. O crescimento bacteriano nesse meio muda seu aspecto, ou seja, o meio sofre uma turvação.
- Meios semi-sólidos: são aqueles que possuem na sua composição, além dos nutrientes, uma pequena porcentagem de um polissacarídeo proveniente de algas marinhas, chamado **ágar**. São geralmente utilizados em tubos e a partir desse tipo de cultura é possível observar a motilidade bacteriana.
- Meios sólidos: são aqueles que possuem uma porcentagem maior de ágar (cerca de 15 g/litro de água destilada), além dos nutrientes. Podem ser dispostos em tubos ou em Placas de Petri, dependendo da finalidade. Através do meio sólido em placas de Petri é possível, utilizando-se a técnica do esgotamento, conseguir o isolamento de colônias bacterianas e, portanto, é o meio ideal para que seja feito o estudo da morfologia colonial. Já a cultura em ágar inclinado fornece somente o crescimento bacteriano com a obtenção de uma biomassa de microrganismos.

Quanto à função:

- Meios simples: possuem os componentes essenciais para o crescimento de microrganismos pouco exigentes. Ex: caldo simples.
- Meios de enriquecimento: são adicionadas ao meio simples substâncias enriquecedoras como sangue, soro, ovo, extrato de leveduras, etc. Ex: Ágar sangue.
- Meios seletivos: aqueles que favorecem o desenvolvimento de determinados microrganismos em detrimento de outros, geralmente pela adição de substâncias inibidoras. Ex: Ágar *Salmonella-Shigella*.
- Meios diferenciais: permitem o desenvolvimento de grupos de microrganismos com características relativamente definidas, o que permite diferenciar um grupo ou uma espécie de microrganismo. Ex: Ágar MacConkey.
- Meios de manutenção: destinados a manter a viabilidade de uma cultura bacteriana. Ex: Ágar Nutriente.

Quanto à natureza:

- Meios animados: são constituídos de células vivas, como animais de laboratório, tecidos vivos ou ovo embrionado.

- Meios inanimados: não possuem células vivas. Podem ser naturais ou sintéticos. Naturais são aqueles que possuem substâncias provenientes da natureza, e o sintético contém substâncias obtidas em laboratório. Ainda podemos obter meios de cultivo semi-sintéticos, que são resultantes da união dos dois anteriores.

Os meios de cultivo são preparados e armazenados seguindo um rigoroso controle de qualidade, pois devem ser mantidas todas as suas propriedades nutricionais e garantida a esterilidade até o momento de sua utilização.

Posterior à incubação, em temperatura e atmosfera adequadas, de um meio líquido, o crescimento pode-se revelar por diferentes aspectos:

- presença de turvação no meio
- presença de película
- presença de depósitos

(Todos evidenciados pelo exame macroscópico ou visual do meio de cultura)

Microrganismos anaeróbicos:

- Como os anaeróbicos podem ser mortos pela exposição ao oxigênio, meios especiais, chamados de **meios redutores**, devem ser utilizados
- Incubação com tensão de oxigênio reduzida
- Meios de cultura redutores (PRAS)
- Cisteína como agente redutor ou Azul de metileno como indicador de óxido redução.

6.1.2 Preparo do meio de cultura

- Pesagem do meio de cultura.
- Hidratação com água destilada
- Esterilização do meio em autoclave (121°C por 15 min).
- Distribuição do meio de cultura em placas ou tubos previamente esterilizados.
- Inoculação (semeadura) da amostra através de alças inoculadoras, ou cotonetes.
- Observar, através do exame visual/macroscópico, o crescimento através da presença de turvação do meio, presença de película e presença de depósito.

6.1.3 Meios de cultura, composição e indicação

a) Tioglicolato

Caldo Tioglicolato (Bacto®)

Peptona de caseína.....	15,00 g/L
Extrato de Levedura.....	5,00 g/L
Dextrose.....	5,50 g/L
Cloreto de sódio.....	2,50 g/L
Tioglicolato de sódio.....	0,50 g/L
L-cisteína.....	0,50 g/L
pH 7,1 +/- 0,2 / 25°C	

- Dá suporte para o crescimento de vários microrganismos. O potencial de oxidação e redução do tioglicolato e da caseína favorece a anaerobiose suficiente para o desenvolvimento dos estreptococos.
- A dextrose incluída na fórmula é para os microrganismos que tem crescimento vigoroso na presença do carboidrato.
- Usado para o cultivo de microrganismos aeróbios, microaerófilos e anaeróbios. para controle de esterilidade bacteriana de diversos materiais.

Procedimentos:

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Aquecer em bico de Bunsen, até dissolver completamente;
- Distribuir 5 ml por tubo;
- Esterilizar em autoclave.
- pH: 7,2 +/- 0,2

Controle de qualidade:

- Crescimento bom a excelente: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.

Conservação e validade:

- Temperatura ambiente: 3 meses.
- Entre 4 a 8°C: 6 meses.

Inoculação:

- Com auxílio da alça bacteriológica, inocular o material biológico introduzindo a alça até a metade do tubo;
- Retirar a alça sem agitar o tubo;
- Incubar à 35 \pm 1°C por 24 horas.

Interpretação:

- Cor original: amarelo claro.
- Presença de crescimento: turvação do meio.
- Ausência de crescimento: meio permanece inalterado.
- Crescimento de microrganismos anaeróbios: crescimento na profundidade do meio.
- Crescimento de microrganismos aeróbios: crescimento na superfície do meio.

Recomendações:

- Não usar o meio quando estiver com cor rosa ou esverdeado na superfície, pois indica a presença de oxigênio no meio.
- Recomenda-se o uso do meio recém preparado, porém, se não houver a presença de oxigênio, pode-se usar um período maior.
- Não usar meios que estejam turvos.
- Não utilizar o meio quando o indicador atingir a metade do volume do meio.

b) Ágar-Tioglicolato

Ágar Tioglicolato (Bacto®)

Peptona de caseína.....	15,00	g/L
Extrato de levedura.....	5,00	g/L
Dextrose.....	5,50	g/L
Cloreto de sódio.....	2,50	g/L
Tioglicolato de sódio.....	0,50	g/L
L-cisteína.....	0,50	g/L
Ágar.....	0,75	g/L
pH 7,1 \pm 0,2 / 25°C		

- As substâncias redutoras tioglicolato, cisteína e sulfito de sódio produzem uma anaerobiose suficiente para microrganismos anaeróbios exigentes.

- Utilidade: Usado para o cultivo de microrganismos anaeróbios.

Procedimentos:

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Aquecer em bico de Bunsen, até dissolver completamente;
- Distribuir 5 ml por tubo;
- Esterilizar em autoclave.
- pH: 7,2 +/- 0,2

Controle de qualidade:

- Crescimento bom a excelente: Clostridium perfringens ATCC 10543.

Conservação e validade:

- Temperatura ambiente: 18 meses.

Inoculação:

- Com auxílio da alça bacteriológica, inocular o material biológico introduzindo a alça até o fundo do tubo;
- Retirar a alça sem agitar o tubo;
- Incubar à 35 +/- 1°C em jarra com gerador de anaerobiose durante 48 horas.

Interpretação: Cor original: amarelo claro.

- Presença de crescimento: turvação do meio.
- Ausência de crescimento: meio permanece inalterado.

Recomendações:

- Não usar meios que estejam turvos.
- Se necessário, incubar um período superior à 48 horas

c) Infusão de cérebro-coração (BHI)

Caldo cérebro-coração (BHI Bacto®)

Infusão de cérebro.....	200,00 g/L
Infusão de cérebro de boi.....	250,00 g/L
Peptona de proteose.....	10,00 g/L
Dextrose.....	2,00 g/L

Cloreto de sódio.....	5,00 g/L
Fosfato de sódio.....	5,00 g/L
pH 7,4 +/- 0,2 / 25°C	

Gel Infusão de cérebro-coração (BHI Bacto®)

Infusão de cérebro.....	200,00 g/L
Infusão de cérebro de boi.....	250,00 g/L
Peptona de proteose.....	10,00 g/L
Dextrose.....	2,00 g/L
Cloreto de sódio.....	5,00 g/L
Fosfato de sódio.....	5,00 g/L
Ágar.....	15,00 g/L
pH 7,4 +/- 0,2 / 25°C	

• É um meio derivado de nutrientes de cérebro e coração, peptona e dextrose. A peptona e a infusão são fontes de nitrogênio, carbono, enxofre e vitaminas. A dextrose é um carboidrato que os microrganismos utilizam para fermentação.

• Utilidade: Meio para cultivo de microrganismos exigentes como estreptococos, pneumococos, meningococos, enterobactérias, não fermentadores, leveduras e fungos. Pode ser utilizado na preparação do inóculo para teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, para realização de teste de coagulase em tubo, para teste de crescimento bacteriano a 42 e 44°C e para teste de motilidade em lâmina.

Procedimentos:

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Distribuir 3,0 ml em tubos com tampa de rosca;
- Esterilizar em autoclave;
- Retirar os tubos da autoclave e deixar esfriar em temperatura ambiente.

Controle de qualidade:

- Positivo: *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305 e *Candida albicans* ATCC 10231.
- Negativo: meio sem inocular.

Inoculação:

- Com o auxílio de uma alça ou fio bacteriológico, inocular a colônia ou o material a ser testado - realizar o teste com colônias puras de 18 a 24 horas;
- Incubar a 35°C ±2 por 24 a 48 horas;
- Para isolamento de fungos incubar por até 5 dias.

Interpretação:

- Cor original do meio: amarelo claro, límpido.
- Positivo: presença de turvação = crescimento bacteriano.
- Negativo: ausência de turvação.

Conservação e validade:

- Conservar de 4 a 10°C por 6 meses.

Recomendações:

- Para cultivo de anaeróbios, acrescentar 0,1% de ágar.
- Para crescimento de *Haemophilus* e outros fastidiosos é necessário adição de suplementos a base de L-cisteína, NAD (fator V) e hemina (fator X).

d) Letheen Broth

Caldo Letheen Broth (Bacto®)

Peptamina.....	10,00	g/L
Extrato de carne.....	5,00	g/L
Lecitina.....	7,00	g/L
Tween 80.....	5,00	g/L
Cloreto de sódio.....	5,00	g/L
pH 7,0 +/- 0,2 / 25°C		

Ágar Letheen (Bacto®)

Extrato de carne.....	3,00	g/L
Triptona.....	5,00	g/L
Dextrose.....	1,00	g/L
Tween 80.....	7,00	g/L
Lecitina.....	1,00	g/L
Ágar.....	15,00	g/L
pH 7,0 +/- 0,2 / 25°C		

- O nível de nitrogênio é mais alto no Caldo Letheen Modificado para garantir o crescimento do organismo.
- Tween 80 neutraliza os compostos de amônio quaternário e clorexidina.

Procedimentos:

- Dissolva 42,8 g do meio em 1 L de água purificada.
- Aqueça, agitando frequentemente para dissolver completamente o meio.
- Autoclave a 121°C por 15 minutos.

Especificações de Controle de Qualidade Aparência Desidratado:

- O pó é homogêneo, em grumos e bronzeado.

Resposta Esperada de Cultivo:

- Resposta de cultivo no Caldo Lethen com Tween Modificado incubado aerobicamente a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ e observado para crescimento após 18–24 horas.

Armazenamento:

- Armazene o frasco contendo o meio desidratado devidamente fechado entre 2–8°C.
- Uma vez aberto e fechado novamente, coloque o frasco em um ambiente de baixa umidade e na mesma temperatura de armazenamento.
- Proteja contra a umidade e luz mantendo o frasco firmemente fechado.
- O meio desidratado deve ser descartado se não fluir livremente ou se houver mudança na coloração original.
- A validade se aplica ao meio em sua embalagem intacta quando armazenado como indicado.

Limitações do Procedimento:

- Devido à variação nutricional algumas cepas podem apresentar um crescimento fraco ou ausência de crescimento neste meio.

e) Mueller Hinton

Caldo Mueller Hinton (Bacto*)

Infusão de carne.....	300,00	g/L
Casaminiácidos.....	17,50	g/L
Amido.....	1,50	g/L
pH 7,3 +/- 0,2 / 25°C		

Caldo Ágar Mueller Hinton (Bacto*)

Infusão de carne.....	300,00	g/L
Casaminoácidos.....	17,50	g/L
Amido.....	1,50	g/L
Ágar.....	17,50	g/L
pH 7,3 +/- 0,2 / 25°C		

- Ágar padronizado por Kirby e Bauer e pelo NCCLS que oferece condições de crescimento das principais bactérias.

Utilidade: Meio utilizado para a realização do teste de avaliação da resistência aos antimicrobianos pelos métodos de difusão em disco e E-test para enterobactérias, não fermentadores, *Staphylococcus*, *Enterococcus* sp.

Procedimentos:

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Acertar o pH (7,2 – 7,4);
- Retirar da autoclave e medir novamente o pH;
- Distribuir 50 a 60 ml em cada placa de 150 mm;
- Deixar esfriar em temperatura ambiente;
- Embalar as placas com plástico PVC transparente e guardar em geladeira (4 a 8°C).

Obs: É extremamente importante que o meio tenha espessura homogênea de 3 a 4 mm. Controle de qualidade Crescimento:

- Preparar uma suspensão de *Escherichia coli* ATCC 25922 na escala 0,5 de Mac Farland; Diluir: 1:100 (0,1ml em 9,9 ml de solução fisiológica);
- Semear 0,01 ml da suspensão na placa. Incubar a placa 35°C por 24 horas.

Obs: A aprovação final do meio deve ser feita após os testes com antibióticos, uma vez que inúmeras variáveis como níveis de timina, timidina, de cálcio e magnésio só podem ser verificadas após o teste com os antibióticos ter sido realizado.

Inoculação:

- Preparar uma suspensão da bactéria a ser testada em salina 0,9% ou caldo TSB na escala 0,5 Mac Farland;
- Embeber o *swab* na suspensão, comprimí-lo na parede do tubo (para eliminar o excesso) e semear na placa;
- Acrescentar os discos a serem testados;

- Incubar a placa de acordo com instruções do NCCLS para a bactéria a ser testada.

Interpretação:

- Cor original do meio: amarelo palha.
- A zona do diâmetro é particular para cada droga e organismo, sendo comparado com diâmetros padronizados pelo NCCLS, que determina cada microrganismo sendo sensível, intermediário ou resistente.

Conservação e validade:

- Conservar embalado de 4 a 8°C por até 3 meses.

Principais variáveis que podem interferir no resultado do antibiograma:

- Níveis de Ca²⁺, Mg²⁺ : altas concentrações levam a diminuição na atividade de aminoglicosídeos diante de Pseudomonas aeruginosa e da atividade de tetraciclinas para todas as bactérias.
 - Concentrações diminuídas levam a resultados contrários.
 - Concentração de timidina ou timina: concentrações em excesso levam à falsa resistência para sulfonamidas e trimetropima.
 - pH: em pH baixo vamos observar halos de inibição reduzidos para aminoglicosídeos, quinolonas, macrolídeos e lincosaminas e halos aumentados para outros antibióticos (penicilina e tetraciclinas). O aumento do pH leva a resultados opostos aos anteriores.
- Espessura do meio: < de 3 mm leva à falsa sensibilidade geral e > 4 mm leva à falsa resistência.

f) Ágar Mueller Hinton Sangue

- Ágar padronizado por Kirby e Bauer e pelo NCCLS que oferece condições de crescimento das principais bactérias.
- Utilidade: Meio utilizado para a realização do teste de avaliação da resistência aos antimicrobianos pelos métodos de difusão em disco e E-test de cepas de Streptococcus pneumoniae e estreptococos beta-hemolíticos dos grupos A,B,C e G conforme instruções do NCCLS.
- Fórmula / produto: Meio comercial: Ágar Muller Hinton. Sangue de carneiro desfibrinado.

Procedimentos:

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Acertar o pH (7,2 – 7,4); *f* Retirar da autoclave e resfriar a 50°C;
- Adicionar 50 ml de sangue de carneiro desfibrinado por litro de meio de cultura de forma asséptica;
- Homogeneizar bem sem formar espuma;
- Distribuir 50 a 60 ml em cada placa de 150 mm;
- Deixar esfriar em temperatura ambiente;
- Embalar as placas com plástico PVC transparente e guardar em geladeira de 4 a 8°C.

Obs: É extremamente importante que o meio tenha espessura homogênea de 3 a 4 mm.

Controle de qualidade:

- Crescimento: Preparar uma suspensão de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305 na escala 0,5 de Mac Farland;
- Diluir 1:100 (0,1 ml em 9,9 ml de solução fisiológica);
- Semear 0,01 ml da suspensão na placa;
- Incubar a placa 35°C por 20 a 24 horas com 5% de CO².
- Se a bactéria crescer em 24 horas, o lote está pronto para uso.

Obs: A aprovação final do meio deve ser feita após os testes com antibióticos, uma vez que inúmeras variáveis como níveis de timina, timidina, de cálcio e magnésio só podem ser verificadas após o teste com os antibióticos ter sido realizado.

Inoculação:

- Preparar uma suspensão da bactéria a ser testada em salina 0,9% ou caldo TSB na escala 0,5 Mac Farland;
- Embeber o “swab” na suspensão, comprimí-lo na parede do tubo (para eliminar o excesso) e semear na placa;
- Acrescentar os discos a serem testados;
- Incubar a placa de acordo com instruções do NCCLS para a bactéria a ser testada.

Interpretação:

- Cor original do meio: vermelho.

A zona do diâmetro é particular para cada droga e organismo, sendo comparado com diâmetros do NCCLS, que determina cada microrganismo sendo sensível, intermediário ou resistente.

Conservação e validade:

- Conservar de 4 a 8°C por até 3 meses.

Recomendações: Principais variáveis que podem interferir no resultado do antibiograma:

- Níveis de Ca²⁺, Mg²⁺: altas concentrações levam a diminuição na atividade de tetraciclinas para todas as bactérias. Concentrações diminuídas levam a resultados contrários.
- Concentração de timidina ou timina: concentrações em excesso levam à falsa resistência para sulfonamidas e trimetropima.
- pH: em pH baixo vamos observar halos de inibição reduzidos para quinolonas, macrolídeos e lincosaminas e halos aumentados para outros antibióticos (penicilina e tetraciclinas). O aumento do pH leva a resultados opostos aos anteriores.
- Espessura do meio: < de 3 mm leva à falsa sensibilidade geral e > 4 mm leva à falsa resistência.

g) Mitis Salivairus

Ágar Mitis Salivaris (Bacto®)

Triptona.....	10,00	g/L
Peptona dextrose.....	5,00	g/L
Dextrose.....	1,00	g/L
Sacarose.....	50,00	g/L
Fosfato dipotássico.....	4,00	g/L
Azul tripan.....	0,075	g/L
Cristal violeta.....	0,0008	g/L
Ágar.....	15,00	g/L
pH 7,0 +/- 0,2 / 25°C		

- Ágar Mitis Salivarius é utilizado para o isolamento de Streptococcus mitis, Streptococcus salivarius e Enterococcus.
- Sumário e Explicação do Produto: Streptococcus mitis, Streptococcus salivarius e Enterococcus spp. fazem parte da flora normal humana. S. mitis e S. salivarius são conhecidos como estreptococos viridans. Esses organismos estão envolvidos na cariogênese e endocardite infecciosa e causam um aumento do número de bactérias no sangue. Enterococos causam infecção do trato urinário, infecções de lesões, aumento de bactéria no sangue e podem colonizar a pele e membranas mucosas.
- A Digestão Enzimática de Caseína e Digestão Enzimática de Tecido Animal, fornecem carbono, nitrogênio e aminoácidos necessários para o crescimento dos organismos no Ágar Mitis Salivarius.
- A Sacarose e Dextrose são as fontes de carboidrato.
- O Fosfato Dipotássico é o agente tamponante.
- O Azul de Tripán é absorvido pelas colônias, produzindo a cor azul.
- Cristal Violeta inibe a maioria dos bacilos Gram-negativos e bactérias Gram-positivas, exceto Streptococcus.

Procedimento

- Suspenda 90 g do meio em 1 L de água purificada.
 - Aqueça, agitando frequentemente e ferva por 1 minuto para dissolver completamente o meio.
 - Autoclave a 121°C por 15 minutos.
- 4• Resfrie o meio a 50–60°C e adicione asepticamente 1 mL do Suplemento Telurito (1%) Chapman (# 7989)

Especificações do Controle de Qualidade Aparência Desidratado:

- O pó é homogêneo, fluxo livre e bege azulado claro.
- Aparência Preparado: O meio preparado é ligeiramente turvo e azul Royal.

h) Sacarose Bacitracina 20 (SB 20)

Casitona	15,00	g/L
Extrato de levedura	5,00	g/L
L-cisteína	0,20	g/L
Sulfito de sódio	20,00	g/L

Acetato de sódio	200,00 g/L
Sacarose	25,00 g/L
Ágar	15,00 g/L
Água destilada	1000 mL

- Empregado para o isolamento e contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) dos estreptococos do grupo mutans.
- Streptococcus beta hemolítico do grupo A são sensíveis a concentrações baixas de bacitracina.
- Identificação presuntiva de Streptococcus beta hemolítico do grupo A (*S. pyogenes*).
- Produto Discos de bacitracina de 0,04 unidades/ disco.

Controle de qualidade:

- Positivo (Sensível): *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.
- Negativo (Resistente): *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813.

Conservação e validade:

- Manter à 4°C.

Validade: ver recomendações do fabricante.

Inoculação:

- À partir de caldo BHI ou TSB recém turvado, semear na superfície do meio Mueller hinton sangue, com auxílio do *swab*;
- Colocar um disco de bacitracina e pressionar levemente;
- Incubar: à 35°C 18 a 24 horas.

Interpretação:

- Positivo (Sensível): Presença de qualquer halo ao redor do disco.
- Negativo (Resistente): ausência de halo ao redor do disco.

Recomendações:

- Streptococcus alfa hemolíticos são sensíveis a baixas concentrações de bacitracina.
- Não existem dados disponíveis que indiquem a necessidade de medir os halos de inibição.

- O inóculo bacteriano deve ser confluyente, inóculo muito diluído pode permitir que os Streptococcus não pertencentes ao grupo A pareçam sensíveis à bacitracina.

i) Rogosa SL

Caldo Rogosa SL (Bacto®)

Triptona.....	10,00	g/L
Extrato de levedura.....	5,00	g/L
Dextrose.....	10,00	g/L
Arabinose.....	5,00	g/L
Sacarose.....	5,00	g/L
Acetato de sódio.....	15,00	g/L
Fosfato monopotássico.....	6,00	g/L
Sulfato de magnésio.....	0,57	g/L
Sulfato de manganês.....	0,12	g/L
Sulfato ferroso.....	0,30	g/L
Tween 80.....	1,00	g/L
pH 5,4 +/- 0,2 / 25°C		

Ágar Rogosa SL (Bacto®)

Triptona.....	10,00	g/L
Extrato de levedura.....	5,00	g/L
Dextrose.....	10,00	g/L
Arabinose.....	5,00	g/L
Sacarose.....	5,00	g/L
Acetato de sódio.....	15,00	g/L
Fosfato monopotássico.....	6,00	g/L
Sulfato de magnésio.....	0,57	g/L
Sulfato de manganês.....	0,12	g/L
Sulfato ferroso.....	0,30	g/L
Tween 80.....	1,00	g/L
Ágar.....	15,00	g/L
pH 5,4 +/- 0,2 / 25°C		

Rogosa agar é um meio seletivo para o cultivo de lactobacilos de várias origens. Possui alta concentração de acetate baixo pH, por isso impede o crescimento de outras bactérias e permitindo apenas o crescimento de lactobacilos..

Procedimentos

- Prepare um solução aquosa, com todos os ingredients, exceto o ácido acético em e aqueça até a fervura para dissolver completamente
- Adicione o ácido acético e misture bem
- Ajuste o pH para 5.5 a 50°C.
- Aqueça a 95°C por 3 min. Não leve a autoclave.
- Esfrie a 50°C e distribua na placa de petri esterilizada.

Propriedades físicas:

- Ligeiramente opalescente a em pH 5,5 a 50°C.

Prazo de validade:

- 5-7 dias a 4°C

Inoculação:

- Espalhamento sobre toda a placa ou método modificado Miles-Msra.

Método de incubção:

- Depende do microorganismo e do seu metabolismo.
- Devem ser realizadas sob condições anaeróbicas e microaeróbicas.

Análise dos resultados:

- Os resultados devem ser lidos após a incubação.

j) Sabouraud

Caldo Sabouraud (Bacto®)

Neopeptona.....	10,00 g/L
Dextrose.....	40,00 g/L
Ágar.....	11,00 g/L
pH 5,6 +/- 0,2/ 25°C	

Ágar Sabouraud (Bacto®)

Neopeptona.....	10,00 g/L
Dextrose.....	40,00 g/L
pH 5,6 +/- 0,2/ 25°C	

- Meio com nutrientes que favorece o crescimento de diversos fungos leve duriformes e filamentosos.
- Cultivo e crescimento de espécies de *Candidas* e fungos filamentosos, particularmente associados a infecções superficiais.
- Caracterização macroscópica do fungo filamentoso (colônia gigante).
- Fórmula / produto: Meio comercial: Sabouraud Dextrose Ágar.

Procedimentos:

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Esterilizar em autoclave;
- Resfriar à +/- 50°C e distribuir em placas de 90 mm de diâmetro ou 4 ml por tubo;
- Se distribuir em tubos, deixar solidificar com inclinação em forma de bico de flauta (ângulo de 45°).
- pH: 5,6 +/- 0,1

Controle de qualidade:

- Crescimento bom a excelente: *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus niger* ATCC 16404.

Conservação e validade:

- Conservar embalado de 4 a 8°C por até 6 meses.

Inocular:

- sempre dois tubos ou placas;
- Se em placa: semear com a técnica de semeadura quantitativa;
- Se em tubo: semear na superfície inclinada do meio;
- Incubar um dos meios semeados em temperatura ambiente e o outro à 37°C;
- Observar diariamente a presença ou não de crescimento;
- Incubar 40 dias.

Interpretação:

- Cor original do meio: amarelo claro opalescente.
- Após o crescimento, deve-se seguir a identificação do microrganismo que cresceu.

Recomendações:

- Recomenda-se o uso de meios em tubos, pois a incubação demorada resseca com facilidade o meio contido em placas.
- Não usar meios vencidos e/ou ressecados.
- Para suspeitas de *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides*

k) Chapman

Ágar Chapman (Bacto®)

Extrato de leveduras.....	2,50	g/L
Triptona.....	10,00	g/L
Gelatina.....	30,00	g/L
D-manitol.....	10,00	g/L
Cloreto de sódio.....	55,00	g/L
Sulfato de amônia.....	75,00	g/L
Fosfato dipotássico.....	5,00	g/L
Ágar.....	15,00	g/L
pH 7,0 +/- 0,2/ 25°C		

- O meio gelosado de Chapman - Manitol com Cloreto de Sódio é um meio seletivo para o isolamento e a contagem de *Estafilococos*. É também utilizado para a diferenciação entre as espécies fermentadoras de manitol e as espécies não fermentadoras de manitol.
- A seletividade deste meio baseia-se na presença de cloreto de sódio, o qual inibe o crescimento da maioria das bactérias Gram (+) e Gram (-). A diferenciação dos *Estafilococos* baseia-se na sua capacidade de fermentação do manitol. A fermentação do manitol induz uma acidificação, a qual torna o meio amarelo na presença de vermelho de fenol (indicador de pH).

Apresentação:

- Meio pronto a usar: - caixa contendo 20 placas de Petri (90 mm) (MSA) código 63844
- Meio pronto a usar (a ser fornecido) - 6 frascos x 200 ml (MSA) código 53647
- Meio desidratado - Frasco de 500 g código 64134 4-

Composição teórica (g/l de água destilada)

- Peptona 10
- Extracto de carne 1

- Cloreto de sódio 75
- Manitol 10
- Vermelho de fenol 0,025
- Gelose 15
- pH final: $7,4 \pm 0,2$

Procedimentos:

- Homogenize o pó contido no frasco.
- Adicione 111 gramas de meio desidratado a um litro de água destilada estéril.
- Misture até obter uma suspensão homogênea.
- Aqueça suavemente, com agitação frequente e, em seguida, deixe ferver até completa dissolução. Esterilize na autoclave a 121°C durante 15 minutos.
- Coloque em placas de Petri ou em frascos.

Conservação:

- Meio pronto a usar (placas de Petri): a $+2-8^{\circ}\text{C}$.
- Meio pronto a usar (tubos e frasco): a $+2-8^{\circ}\text{C}$.
- Meio desidratado: frasco bem fechado em local seco a $+15-25^{\circ}\text{C}$. O prazo de validade e o número do lote estão indicados na embalagem.

Instruções:

- Material fornecido: Meio gelosado de Chapman - Manitol com Cloreto de Sódio

Inoculação:

- Inocule diretamente da amostra em estudo pelo método de estrias.
- Consulte as atuais recomendações para conservação de amostras biológicas (2).
- Incubação: Incube durante 24 a 48 horas a 37°C .

Leitura:

- Manitol (+): a cor do meio torna-se amarela.
- Manitol (-): sem coloração.
- As estirpes de *Estafilococos aureus* produzem o seu próprio pigmento. As colónias apresentam em seu redor um halo amarelo, no espaço de 24 a 48 horas, devido à fermentação do manitol.

- As estirpes de *Staphylococcus epidermidis* e outros *Micrococcus* formam pequenas colónias, as quais, na maioria dos casos, crescem sem modificação da coloração do meio. Contudo, uma considerável minoria de estirpes de *S. epidermidis* são capazes de fermentar o manitol.

Desempenho/controle de qualidade do ensaio:

- Aspecto do meio pronto a usar: agar vermelho transparente.
- Aspecto do meio desidratado: pó cor de rosa.
- As taxas de crescimento do meio gelosado de Chapman - Manitol com Cloreto de Sódio são verificadas com as seguintes estirpes:

I) MacCONKEY

MacCONKEY (Bacto®)

Peptona.....	17,00 g/L
Proteose-peptona.....	3,00 g/L
Lactose.....	10,00 g/L
Sais biliares.....	1,50 g/L
Cloreto de sódio.....	13,50 g/L
Vermelho neutro.....	0,03 g/L
Cristal violeta.....	0,00 g/L
Ágar.....	13,50 g/L
pH 7,1 +/- 0,2/ 25°C	

- O cristal violeta inibe o crescimento de microrganismos Gram positivos especialmente enterococos e estafilococos.
- A concentração de sais de bile é relativamente baixa em comparação com outros meios, por isso não é tão seletivo para Gram negativos como, por exemplo, o ágar SS.
- Utilidade; Isolar bacilos Gram negativos (enterobactérias e não fermentadores) e verificar a fermentação ou não da lactose.
- Fórmula /produto; Meio comercial: Ágar MacConkey.

Procedimentos:

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;

- Aquecer sob agitação até fundir o ágar completamente;
- Esterilizar em autoclave;
- Resfriar até 50°C e distribuir 20 a 25 ml em placas de Petri 90 mm estéreis;
- Deixar em temperatura ambiente até resfriar;
- Embalar as placas com plástico PVC transparente e guardar em geladeira de 4 a 8°C.

Controle de qualidade:

- Positivo: *Proteus mirabilis* ATCC 12453 (não fermentador de lactose).
- Positivo: *Escherichia coli* ATCC 25922 (fermentador de lactose).
- Negativo: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Inoculação

- Inocular as placas e incubar por 18 a 24 horas;
- Se negativo após 24 horas, reincubar por mais 24 horas.

Interpretação:

- Cor original do meio: rosa avermelhado.
- Crescimento de bacilos Gram negativos.
- Colônias cor de rosa: fermentadoras de lactose.
- Colônias incolores: não fermentadoras de lactose.
- Não há crescimento de cocos Gram positivos.

Conservação e validade:

- Conservar as placas embaladas de 4 a 8°C por até 3 meses.

m) Brucella

Ágar Brucella (Bacto®)

Triptona.....	10,00 g/L
Peptamina.....	10,00 g/L
Dextrose.....	1,00 g/L
Extrato de levedura.....	2,00 g/L
Cloreto de sódio.....	5,00 g/L
Bissulfito de sódio.....	0,10 g/L
Ágar.....	15,00 g/L

pH 7,0+/- 0,2/ 25°C

Caldo Brucella (Bacto®)

Triptona.....	10,00 g/L
Peptamina.....	10,00 g/L
Dextrose.....	1,00 g/L
Extrato de levedura.....	2,00 g/L
Cloreto de sódio.....	5,00 g/L
Bissulfito de sódio.....	0,10 g/L
pH 7,0+/- 0,2/ 25°C	

• A Digestão Enzimática de Caseína e a Digestão Enzimática de Tecido Animal são as fontes de nitrogênio e carbono no Ágar Brucella. O Extrato de Levedura é a fonte de vitamina. A Dextrose é o carboidrato. O Cloreto de Sódio mantém o equilíbrio osmótico do meio. O Bissulfito de Sódio é adicionado para ajudar no crescimento. O ágar é o agente solidificante.

Procedimentos:

- Suspenda 43 g do meio em 1 L de água purificada.
- Aqueça, agitando frequentemente e ferva por 1 minuto para dissolver completamente o meio.
- Autoclave a 121°C por 15 minutos.

Especificações de Controle de Qualidade Aparência Desidratado:

- O pó é homogêneo, fluxo livre e bege claro.

Aparência Preparado:

- O meio preparado é ligeiramente turvo e bege amarelado.
- O meio preparado com 5% de sangue de ovelha é opaco e vermelho.

Resposta Esperada de Cultivo:

- Resposta de cultivo no Ágar Brucella a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ sob CO_2 (somente Brucella sp.) e examinado para crescimento após 18–96 horas de incubação.

6.2 Técnicas de Semeadura

Inoculação ou plantio de um microrganismo em um meio de cultura, a partir de uma amostra.

6.2.1 Semeadura em meios sólidos

Procedimentos:

- Flambar e esfriar a alça de inoculação
- Inocular o material na parte superior da placa e selecionar a técnica de semeadura escolhida
- Fechar a placa e identificar
- Levar para incubação em estufa com a tampa voltada para baixo

Técnicas de semeadura em meios sólidos

a) Estrias múltiplas para isolamento: espalhamento do material com o auxílio de uma alça fazendo estrias em zig zag até o esgotamento do material, visando obter o isolamento bacteriano.

b) Espalhamento (*Spread-Plate*): espalhar o material na superfície de uma placa com meio de cultura sólido, formando um tapete uniforme com o auxílio de swab ou alça de Drigalski estéril. Espalhar o material por toda a superfície.

c) Em profundidade (*Pour-Plate*): depositar amostra no fundo da placa, adicionar o meio de cultura estéril.

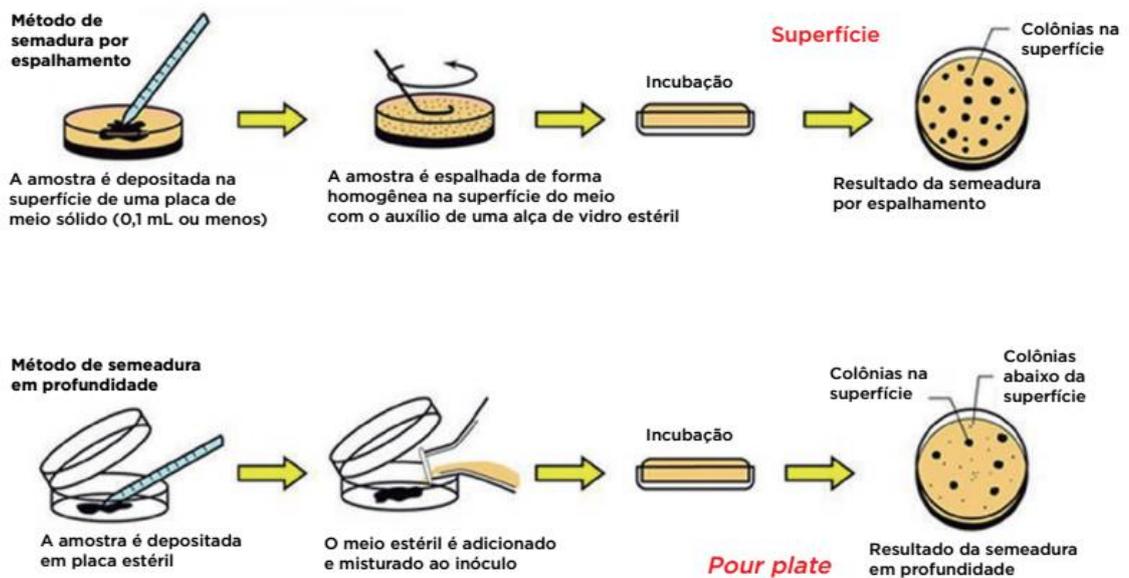


Fig. 13 – Fonte: Denise M. Palomari Spolidorio Renata Serignoli Francisconi Patricia Milagros Maquera Huacho Caroline Coradi Tonon Ester Alves Ferreira Bordini Luís Carlos Spolidorio In: Estrela, Carlos. Metodologia Científica: Ciência, Ensino, Pesquisa (Página 561).

6.2.2 Semeadura em meios líquidos

Procedimentos

- Flambar a alça e esfriar
- Flambar a boca do tubo
- Colocar a alça fria no interior do tubo que contem a amostra e retirar o inóculo
- Flambar a boca do tubo onde ira ser realizada a semeadura
- Semear o material, flambar a boca do tubo e fechar
- Levar o tubo para incubação na estufa

7. Métodos de quantificação de microrganismos

7.1 Medidas Diretas

7.1.1 Contagem em placas (Unidades Formadoras de Colônias – UFC)

- Mede o número de microrganismos viáveis, que são contadas em Unidade Formadora de Colônia (UFC).
- São necessárias 24 horas para que as colônias visíveis sejam formadas.

Vantagens:

- Somente células viáveis são contadas;
- Permite o isolamento das colônias, que podem ser subcultivadas em culturas puras, as quais podem ser facilmente estudadas e identificadas.

Desvantagens:

- Não existe um meio que permita o crescimento de todos os microrganismos; É necessária a incubação apropriada para permitir o desenvolvimento das colônias;
- Relativamente trabalhoso; • A necessidade de muita manipulação pode originar erros nas contagens devido a erros de diluição e/ou plaqueamento.

Método de diluição seriada

É importante que somente um número limitado de colônias se desenvolva na placa, recomendado pela Food and Drug Administration (FDA) com somente 25 a 250 colônias.

Nas diluições seriadas, o inóculo original é diluído em uma série de tubos de diluições (fig. 14). Posteriormente, amostras de todas as diluições são utilizadas para inocular placas de Petri, nas quais as colônias crescem e podem ser contadas. Essa contagem é então utilizada para estimar o número de bactérias na amostra original.

Procedimento:

- Marcar tubos contendo 9 ml de salina estéril (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} - 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9})
- Homogeneizar o tubo de cultura com o microrganismos e, com pipeta estéril, transferir 1 ml para o tubo da salina marcado 10^{-1}
- Homogeneizar o conteúdo do tubo 10^{-1} , transferindo 1 ml para o tubo de salina marcado 10^{-2} .
- Repetir este procedimento (diluições sucessivas) até o último tubo.

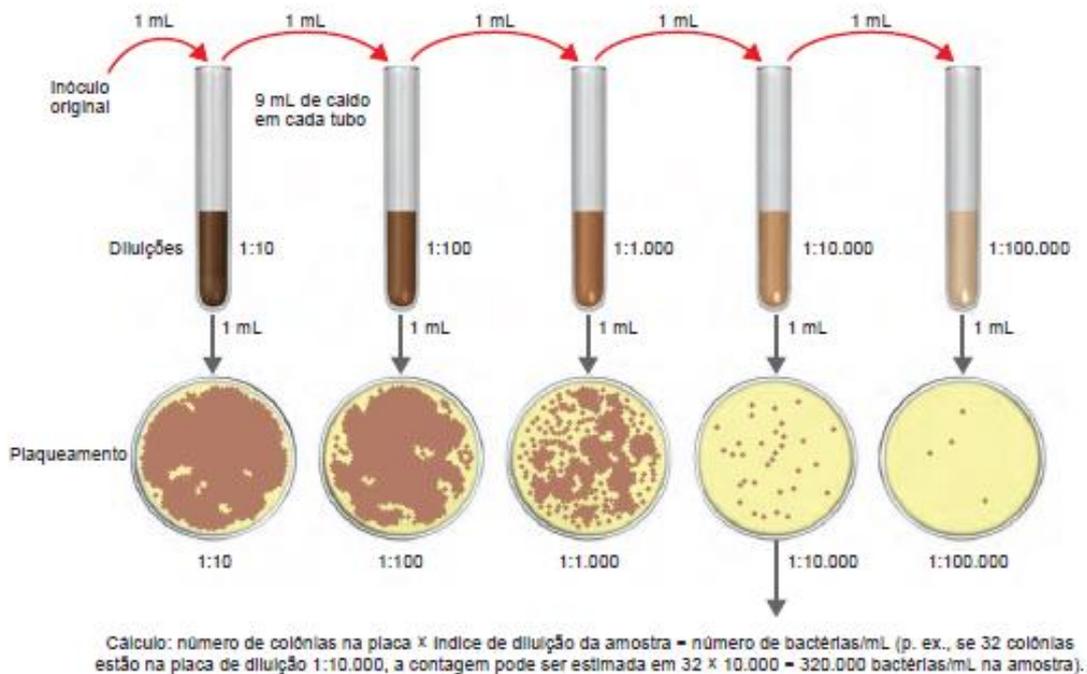


Fig. 14. Fonte: Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia. 12. ed. São Paulo: Artes Médicas; 2017.

a) Técnica de Incorporação em placas - Pour-Plate

- A partir de cada diluição utiliza-se 1,0 ml como inóculo, em duplicata, e distribui-se nas placas previamente esterilizadas.
- Em seguida, pega-se o meio nutritivo líquido, aquecido em banho-maria a 50 °C e esfriado e verte-se sobre a placa de Petri contendo a suspensão diluída da amostra.
- O material é homogeneizado girando-se a placa através de movimentos circulares no sentido horário e anti-horário ou efetuando-se movimento descrevendo-se o número oito por cerca de 10 vezes.
- Após a solidificação do meio (ágar), as placas tampadas são invertidas e incubadas em estufas na temperatura e atmosfera apropriadas.
- As colônias crescerão dentro do ágar nutritivo e na superfície da placa de ágar.
- Ao final da incubação, usualmente 48 horas, as colônias são contadas e o resultado médio de cada diluição é registrado e multiplicado pelo fator da diluição, que é a recíproca da diluição. (fig. 15)
- As placas adequadas para contagem devem ter entre 30 a 300 colônias. Exemplo, 100 colônias na diluição 1/100, o resultado é 10.000 UFC/ml ou grama da amostra. Usualmente, o resultado final é registrado em UFC que significa unidades formadoras.

de colônias isto porque em algumas situações não é uma única célula que dá origem a uma colônia, mas um agregado de células.

b) Método de espelhamento – Spread Plate

- A partir de cada diluição utiliza-se 1,0 ml como inóculo, adicionado a superfície de um meio de ágar previamente solidificado.
- O inóculo é então espalhado de modo uniforme na superfície do meio com um bastão de vidro em L esterilizado. Esse método espalha todas as colônias na superfície e evita o contato entre as células e o ágar fundido. (fig. 15)

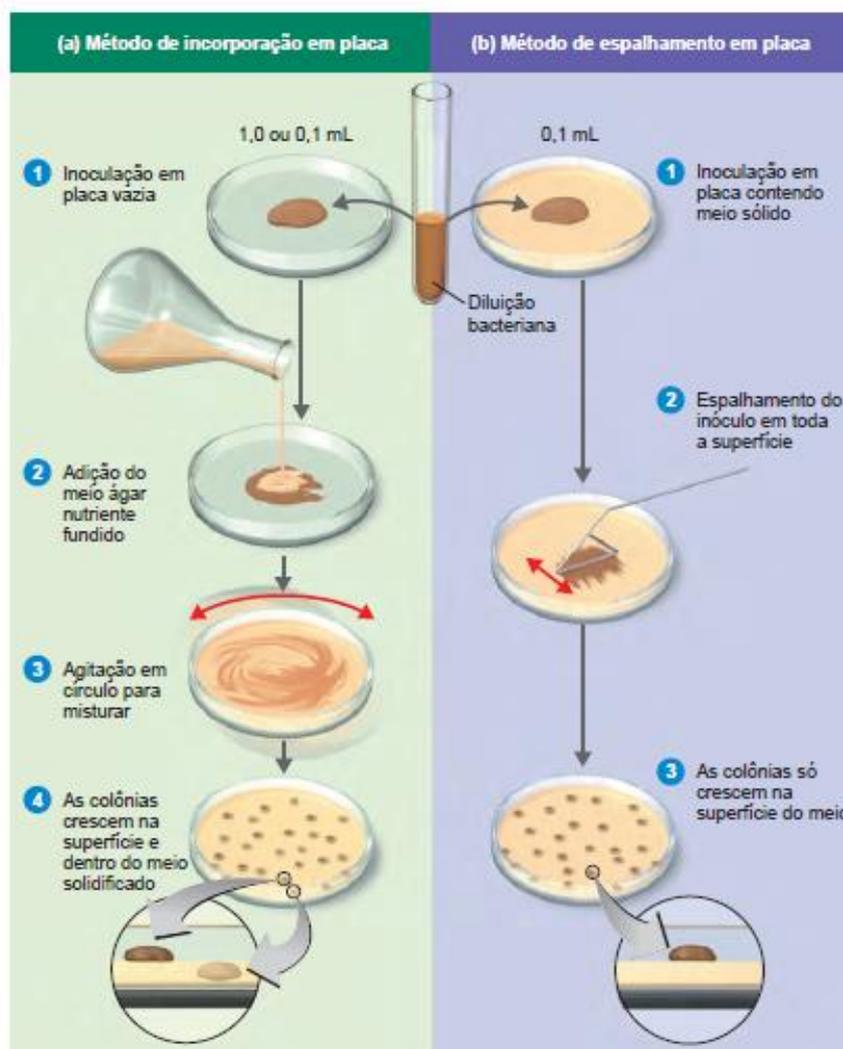


Fig. 15. Fonte: Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia. 12. ed. São Paulo: Artes Médicas; 2017

7.1.2 Contagem microscópica direta

- Coloca-se um determinado volume de uma suspensão bacteriana é colocada dentro de uma área definida em na lâmina microscópica chamada de Contador de Células de Petroff-Hausser. (Fig. 16).

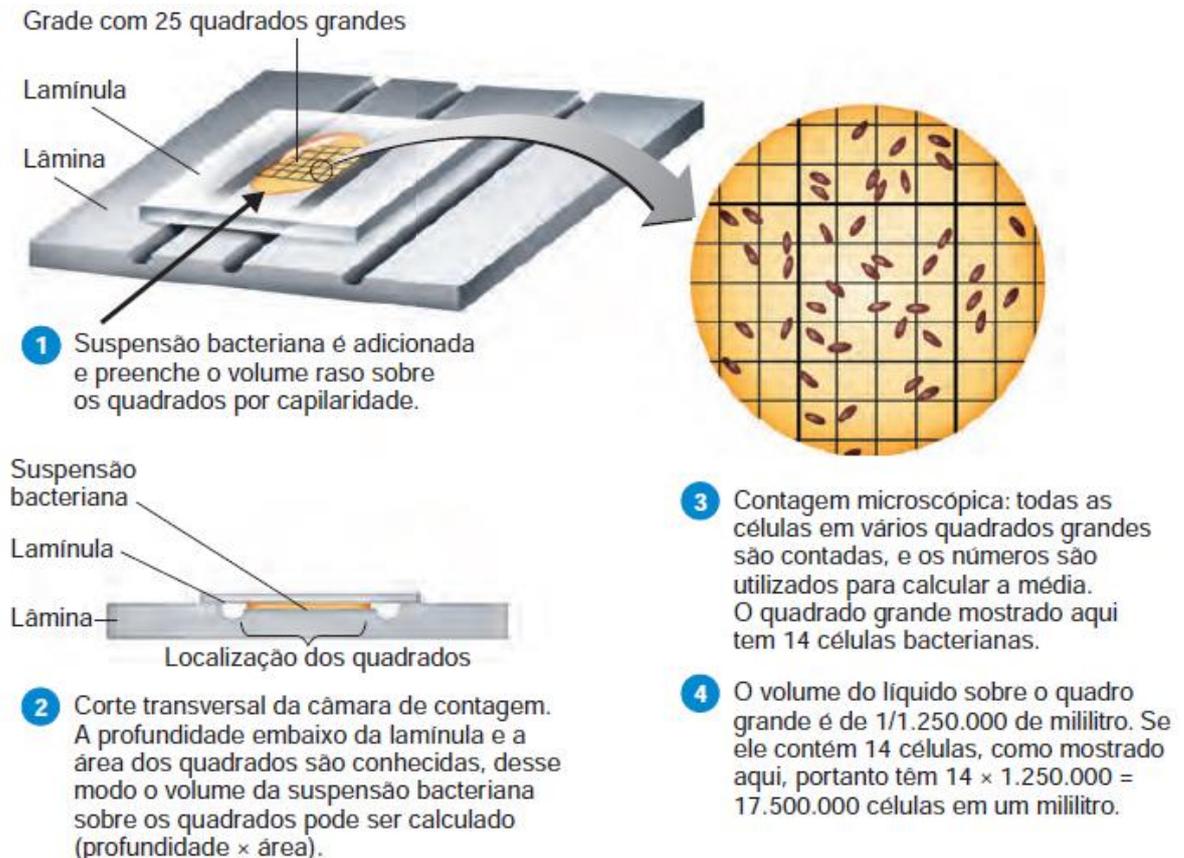


Fig. 16. Fonte: Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia. 12. ed. São Paulo:

Artes Médicas; 2017

7.2 Medidas Indiretas

7.2.1 Turbidimetria

Mede-se o crescimento bacteriano pela medida de turbidez. A medida que as bactérias crescem e se multiplicam, o meio se torna turvo e opaco.

- Leva-se o tubo contendo os microorganismos a serem contados ao aparelho espectrofotômetro.

- No aparelho, um feixe de luz é transmitido através de da suspensão bacteriana até um detector fotossensível. Com o aumento do número de bactérias, menos luz atingirá o detector.
- A alteração de luz, a porcentagem de transmissão e a absorbância, são registradas na escala do aparelho.
- Mais de 1 milhão de células por litro devem estar presentes para que os primeiros sinais de turbidez sejam visíveis.
- A quantidade de luz que chega ao detector sensível à luz no espectrofotômetro é inversamente proporcional ao número de bactérias sob condições padronizadas (fig. 17)

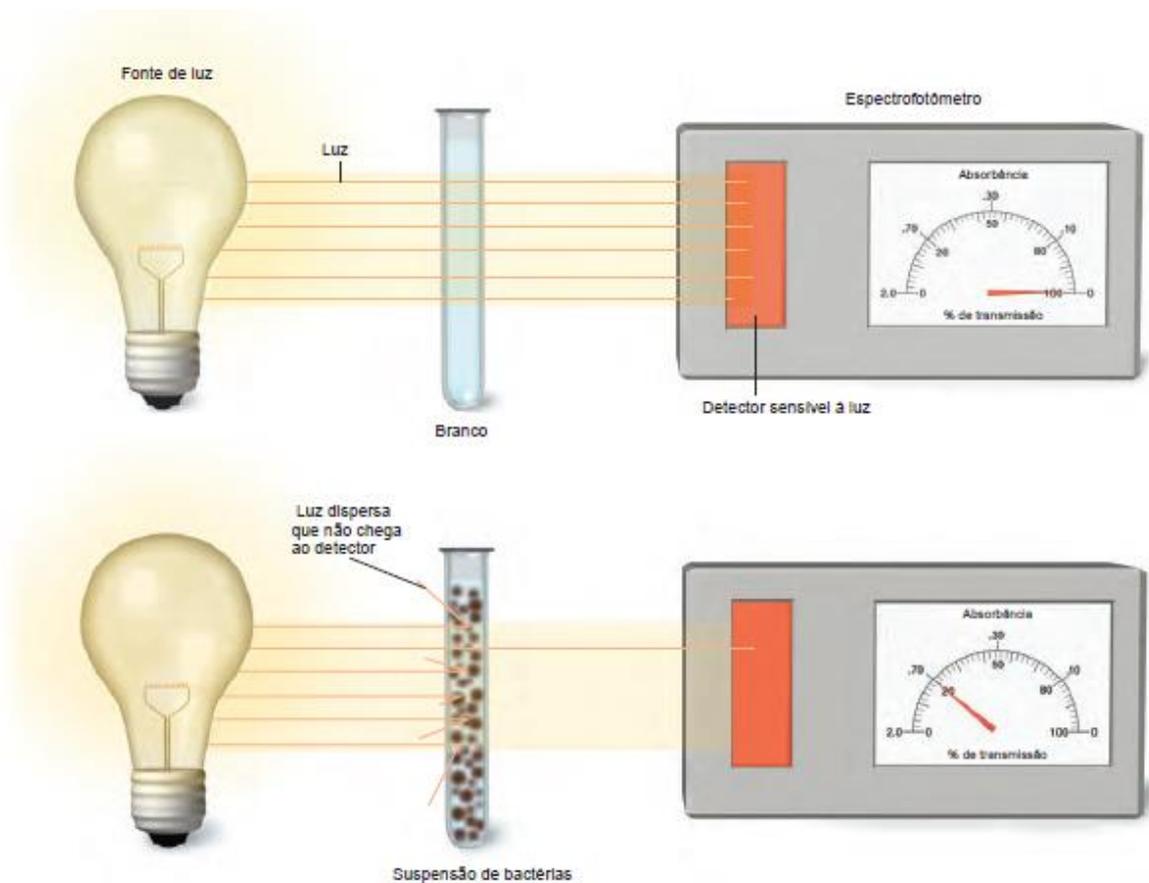


Fig. 17. Fonte: Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia. 12. ed. São Paulo: Artes Médicas; 2017

7.3 Testes Colorimétricos

7.3.1 Cristal violeta

- Consiste na ligação do corante a moléculas carregadas negativamente, como as proteínas das células bacterianas ou componentes da matriz extracelular.
- Não seleciona microorganismos viáveis.

Procedimento:

- Aplicar uma solução de cristal violeta a 0,5% sobre a cultura do biofilme
- Após 20 min de incubação à temperatura ambiente, lavar quatro vezes com solução tampão com leve agitação durante 5 min nas últimas duas lavagens
- Adicionar etanol a 95% e incubação à temperatura ambiente num agitador rotativo (250 rpm) durante 15 min.
- Avaliação da absorção utilizado um fotômetro 595 nm.

7.3.2 Teste da Resazurina

- Permite avaliar a presença microbiana em função da mudança de cor no meio.
- O teste baseia-se na redução da resazurina (cor púrpura) em resarufina (cor rósea).
- O reagente resazurina é obtido como pó.

Procedimentos:

- Preparo da solução em água destilada e esterilizada por filtração através de membrana de 0,2 mm e armazenada a 4°C por no máximo 1 semana.
- Após o tempo de incubação do filme, este deve ser lavado com solução PBS estéril
- A solução de resazurina (1pp µg/mL) é adicionada em cada orifício das microplacas
- As placas devem ser incubadas em estufa ou câmara de anaerobiose de acordo com cada tipo de microorganismo.
- Após 2 horas a presença de cor azul representa ausência de crescimento, e a cor rosa, a presença de crescimento bacteriano
- Levar o espectrofotômetro 570 e 600 nm para quantificação

7.3.3 Teste XTT

(2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]2H-tetrazolium- carboxanilida)

- Permite a estimativa do metabolismo bacteriano por redução das enzimas desidrogenase presentes no sistema de transporte de elétrons em cristal solúvel em água o formazano, substância de cor laranja.
- Preparar a solução de menadiona em acetona a 0,4 mL
- Preparar o sal de XTT em água ultrapurificada na concentração final de 1 mg/mL
- Filtrar e estocar a solução a -80°C até o uso.
- Preparar a solução de menadiona em acetona a 0,4 mL
- A solução de XTT (158 µL de PBS com 200 mM glicose, 40 µL de XTT e 2 µL de menadiona diluída) deverá ser aplicadas nos poços desejados
- As placas devem ser incubadas por 3 horas no escuro a 37°C.
- A absorbância é determinada em 492 nm por espectrofotômetro
- Realizar todos os ensaios em triplicata em 3 experimentos diferentes.

7.3.4 Ensaio de Biotimer

- Teste capaz de quantificar os microorganismos presentes no biofilme. Mede o metabolismo bacteriano.

Procedimentos:

- Preparar o meio Biotimer fenol vermelho (caldo Mueller Hinton, glicose, vermelho de fenol e água destilada)
- Aplicar sobre o biofilme• O meio mudará da cor vermelha para a amarela se houver concentração de bactérias
- Adicionar a cultura em caldo de microorganismos ao meio Biotimer fenol vermelho
- Realizar diluições em placas de 24 poços e contadas pelo método de unidade formadora de colônias por mL (UFC/mL)
- Incubar a placa a 37°C sem agitação
- Verificar a mudança do meio em tempos regulares
- Para cada diluição o tempo deve ser anotado e registrado

8. Métodos de identificação de microrganismos

Depois de obtido o isolamento do microrganismo em cultura pura, procede-se a identificação dos microrganismos.

- Inspeção da características da colônia: tamanho, forma, elevação, margem, cor, odor e textura
- Exame da morfologia microscopia e características de coloração
- Identificação das condições de crescimento: aeróbica, anaeróbica, crescimento em meio seletivo.

8.1 Série Bioquímica

- Método de identificação de microrganismos baseado em suas características bioquímicas.
- Fermentação e assimilação de carboidratos: incubar a cultura pura com carboidratos específicos (ex. manitol, sorbitol, lactose, melibiose, rafinose) e checar a produção de ácido e gás.
- Perfil enzimático: Incubar a cultura com um substrato de uma enzima específica. Se a enzima for secretada pelo microrganismo, vai gerar uma reação e provocar alteração de cor.

Dentre os testes da série bioquímica, destacam-se aqueles de interesse em Odontologia, nos quais pode-se fazer a identificação e diferenciação dos tipos de estreptococos. A seguir, segue o passo a passo do teste SB-20M, que permite de forma confiável a quantificação e identificação morfológica de *S.mutans* e *S.sobrinus*.



SARAIVA,
e
morfológica

ME – Quantificação
identificação
e bioquímica para

confirmação fenotípica de S.mutans e S.sobrinus, utilizando o meio de cultura SB-20 modificado: Estudos in vitro e in vivo – Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Ribeirão Preto, 2010.

Fig.A: Cultivo das cepas em tubos de ensaio contendo Tio's, para biotipagem. Meio base com indicador (púrpura de bromocresol) empregado para as provas de fermentação de açúcar.

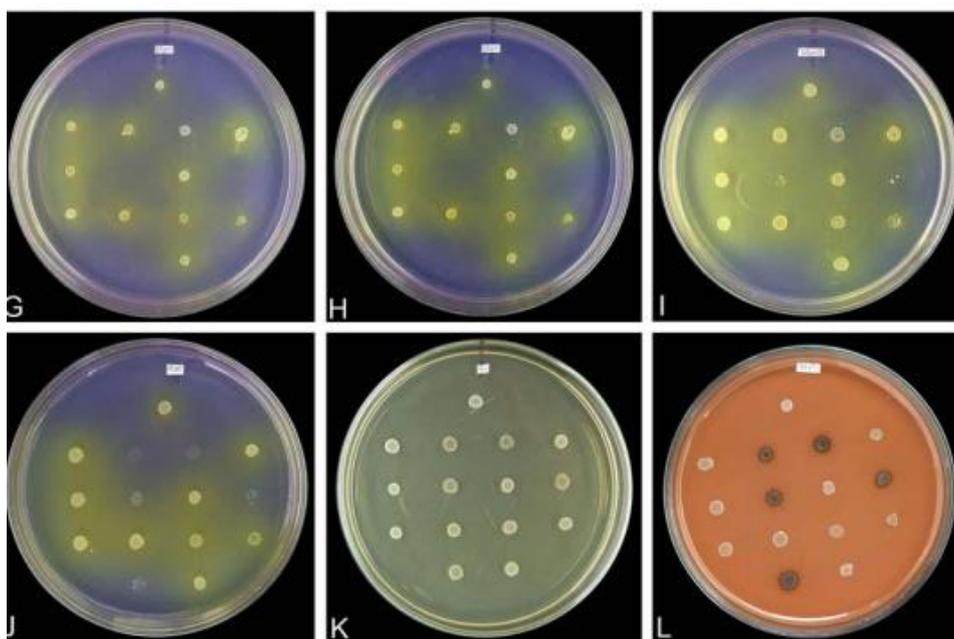
Fig.B: Carimbo de Steers, empregado para semeadura das amostras.

Fig.C: Colocação das amostras na base do carimbo de Steers, para semeadura.

Fig.D: Semeadura das amostras para biotipagem, em meio base com indicador para a fermentação de açúcar.

Fig.E: Semeadura das amostras para biotipagem, em meio para a prova de produção de peróxido de hidrogênio.

Fig.F: Semeadura das amostras para biotipagem, em meio para a prova de resistência à bacitracina.



SARAIVA, ME – *Quantificação e identificação morfológica e bioquímica para confirmação fenotípica de S.mutans e S.sobrinus, utilizando o meio de cultura SB-20 modificado: Estudos in vitro e in vivo – Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Ribeirão Preto, 2010.*

Fig. G: Provas de fermentação dos açúcares Sorbitol.

Fig. H: Provas de fermentação dos açúcares Manitol.

Fig. I: Provas de fermentação dos açúcares Manitol+Bacitracina.

Fig. J: Provas de fermentação dos açúcares Rafinose.

Fig.K: Prova de resistência à bacitracina.

Fig.L: Prova de produção de peróxido de hidrogênio.

Este meio de cultura, como qualquer outro meio seletivo, permite o crescimento de outras espécies de microrganismos, porém facilmente distinguíveis das colônias de *S.mutans* e *S.sobrinus*.

Figuras: A e B: Aspecto morfológico de *S.mutans*: colônias pequenas, duras, translúcidas e rugosas, aderidas ao meio com o aspecto típico de vidro moído.

Fig.C: Colônias de *S.mutans* típicas e colônia de *S.sobrinus* (seta) apresentando-se branco leitosa, com uma gota transparente e cintilante de polissacarídeo.

Fig.D: Colônia de *S.sobrinus* com centro elevado e forma estrelada (3pontas), penetrando no meio de cultura e circundada por halo branco-leitoso.

Fig.E: Aspecto morfológico de *S.sobrinus*: colônia branco-opaca, circundada por halo branco-leitoso.

Fig.F: Aspecto morfológico de *S.sobrinus*, evidenciando colônia estrelada, com forma de 4 pontas, penetrando no meio de cultura e circundada por halo branco-leitoso.

Fig.G: Colônia de *S.mutans* típica e colônia de *S.sobrinus* (seta) de cor branco-leitosa, maior que a de *S.mutans*, com forma estrelada, adentrando no meio de cultura, com uma gota transparente e cintilante de polissacarídeo.

Fig.H: Colônias de *S.mutans* (Sm) e de *S.sobrinus* (Ssob). Colônia de microrganismo contaminante (seta), facilmente distinguível no meio SB-20M.

8.2 Análise por imagem

8.2.1 Microscopia Confocal a Laser

A microscopia confocal a laser se baseia na ligação a componentes celulares, ou constituintes do biofilme, por uso de corantes fluorescentes (conjugados ou não a proteínas) e visualização destes por uso de um apropriado comprimento de onda.

- Permite o estudo de biofilmes hidratados e vivos.
- Fornece informações sobre estruturas 3D e identidade de diferentes componentes.
- Documentar a morfologia e a fisiologia do biofilme, em termos de espessura, área de superfície colonizada, densidade bacteriana e tempo de colonização do substrato sólido, sendo, portanto, um método de avaliação quantitativa e qualitativa.

Procedimento:

- Após o período de incubação do biofilme, transferir os corpos de prova para uma nova placa de 12 poços lavados delicadamente duas vezes com 1 mL de tampão fosfato (PBS) para a remoção de microrganismos não aderidos.
- No momento da análise no microscópio confocal a laser, as amostras devem ser transferidas para poços da placa de cultura de célula para serem coradas utilizando-se o kit Live/Dead® Bac Light Bacterial Viability and Counting (Sigma-Aldrich, USA), em que dois corantes fluorescentes devem ser aplicados simultaneamente com uma diluição de 1:1.000 em PBS, seguindo as recomendações do fabricante, durante 15 minutos.
- Após este tempo, as células devem ser lavadas com PBS para remoção do excesso de corante. Para visualização, as amostras devem ser posicionadas sobre uma lamínula de vidro, a fim de deixar a superfície a ser analisada em contato com a lamínula, o que possibilitará a análise do biofilme formado em microscópio confocal (microscópio confocal de varredura a laser).
- Sessões seriadas no plano xyz serão observadas.
- Em cada experimento, a intensidade da excitação do laser, o nível de fundo, contraste e tamanho do zoom eletrônico devem ser mantidos iguais.
- Uma série de imagens ópticas transversais deve ser adquirida a intervalos de 1 mm de profundidade a partir da superfície através do eixo vertical do corpo de prova usando uma unidade motora controlada por computador.
- As imagens focais devem ser exportadas para um software (ImageJ 1,48 – gratuito)³ para contagem das células viváveis. Primeiro, o fundo deve ser subtraído para remover o ruído e dividir as imagens dos canais de cor.
- Subsequentemente, o número de células vivas (cor verde) deve ser estimado por contagem de pixels específicos de fluorescência em imagens digitais fluorescentes.
- O volume de biofilme (biomassa) por disco pode ser calculado utilizando o pacote de software Imaris® x 64 6.2.1 (Bitplane AG, Zurich, Suíça).

8.2.2 Microscopia eletrônica de varredura

No microscópio eletrônico de varredura (MEV), um feixe extremamente estreito de elétrons é usado para varrer a amostra. O feixe interage com a superfície da amostra e, dentre várias interações entre elas, a emissão de elétrons secundários permite a observação topográfica da superfície.

A imagem é construída em sequencia, à medida que a amostra é varrida. Os elétrons secundários são formados em todo volume de interação do feixe **eletrônico** com a amostra, mas somente aqueles gerados numa distância em que possa haver escape é que trarão informações para a microscopia.

A imagem observada no MEV é o resultado da variação de contraste que ocorre quando um feixe de elétrons primários varre a superfície da amostra em análise ponto a ponto. O MEV é ideal para estudar a topografia de superfície de objetos sólidos, formação de biofilmes, entre outras análises, mas fornece pouca ou nenhuma informação sobre a estrutura interna.

Procedimentos:

- Fixação da amostra fixação em solução fixadora, como glutaraldeído ou formaldeído.
- Desidratação utilizando solventes orgânicos como etanol ou acetona, e então remover os solventes com PBS.
- Se o MEV for equipado com crio-microscopia, então criofixação pode ser usada. O processo de criofixação é o congelando rápido do espécime com nitrogênio líquido ou mesmo hélio líquido, a temperaturas que a água se torne gelo vítreo (não cristalino).
- Outra crio-técnica para amostras biológicas é a crio-fratura, quando a amostra congelada é fraturada com um aparato especial, metalizada e transferida para o crio-holder enquanto permanece congelada.
- Após a fixação, para melhorar o contraste e a condutividade dos elétrons, é necessária a metalização, que é a cobertura da amostra com uma camada ultrafina de material condutivo (ouro, platina, p. ex) depositado tanto por evaporação de alto vácuo quanto por sputter de baixo vácuo na amostra..

- Montar em porta-amostras também chamadas de stubs da câmara do microscópio ajustando-se a melhor orientação em relação ao feixe de varredura e ao coletor de elétrons secundários (SE).
- O ouro tem um alto número atômico e produz alto contraste topográfico e resolução, além de ser um dos materiais mais usados para metalização de amostras de biofilmes em superfícies de dentina, esmalte, resina acrílica, porcelana, cromo-cobalto, titânio, zircônia, lâmina de vidro ou ouro/paládio no caso de biofilmes em fundo de placa de poliestireno.
- Montar em porta-amostras também chamadas de stubs da câmara do microscópio ajustando-se a melhor orientação em relação ao feixe de varredura e ao coletor de elétrons secundários (SE).
- Uma vez fixadas, metalizadas e montadas, as amostras estarão prontas para análise em MEV.

9. Testes Antimicrobianos de substâncias odontológicas

- Métodos qualitativos (teste de difusão em disco – antibiograma)
- Métodos quantitativos (concentração inibitória mínima – CIM e concentração bactericida mínima CBM)

9.1. – Métodos qualitativos

Método qualitativo de identificação do agente infectante e determinação do seu espectro de atividade aos antimicrobianos.

9.1.1 Técnica Antibiograma – Teste de difusão em disco

- Aplicar do inóculo bacteriano com aproximadamente 1 a 2×10^8 UFC/mL e semear o microrganismo a ser estudado em meio de cultura na placa de petri.
- Colocar sobre o meio, um disco de papel de filtro contendo uma quantidade conhecida de antimicrobiano.
- Incubar *overnight*, de 16 a 24 horas a 37°C
- Zonas de inibição de crescimento serão observadas em volta de cada disco, dependendo da sensibilidade do microrganismo ao agente antimicrobiano.

- Os diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano ao redor de cada disco são mensurados em milímetros. Estes são relacionados à sensibilidade da amostra bacteriana e à velocidade de difusão do antimicrobiano no ágar. Quando os halos de inibição são correlacionados aos valores logarítmicos da concentração inibitória mínima (CIM) pela análise de regressão linear, encontra-se uma relação linear consistente demonstrando que o halo de inibição é inversamente proporcional à CIM daquele antimicrobiano.
- Na prática, os resultados do teste de disco-difusão são interpretados comparando o valor do halo de inibição com os critérios publicados pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). Desta maneira, as amostras bacterianas são categorizadas em sensíveis, resistentes ou intermediárias.
- As placas são incubadas por 16 a 24 horas em ar ambiente ou a 5% de CO₂ a 35±2 °C (dependendo do gênero bacteriano e do antimicrobiano testado) antes dos resultados serem determinados.
- O teste não fornece um resultado quantitativo, mas sim qualitativo. Na maioria das situações clínicas, o teste qualitativo é suficiente para orientar a escolha terapêutica.



Fig. 17. Fonte: Labc-HSP. Teste de sensibilidade pelo método de disco-difusão

9.1.2 Teste Ágar diluição

O teste de ágar-diluição é realizado pela incorporação de concentrações seriadas e logarítmicas de um antimicrobiano às placas individuais de Petri que contém meio de cultura. Cada placa representa uma única concentração de antibiótico

- Múltiplas placas são confeccionadas com a finalidade de avaliar diversos antimicrobianos em diferentes concentrações. Geralmente, 6 a 12 placas podem ser necessárias para avaliar a sensibilidade de um antimicrobiano.
- As amostras bacterianas são inoculadas simultaneamente sobre a superfície do ágar utilizando o multi-inoculador, o qual dispensa de 1 a 3 microlitros contendo aproximadamente o inóculo final de 1×10^4 UFC/mL.
- O multi-inoculador possui de 32 a 96 pinos, permitindo que este número de amostras seja inoculado simultaneamente na placa de Petri de 90 e 150 mm, respectivamente.
- As placas inoculadas são incubadas por 16 a 20 horas, a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ (dependendo do gênero bacteriano e do antimicrobiano testado).
- Após este período, a CIM é determinada como a concentração que previne o crescimento macroscópico bacteriano.

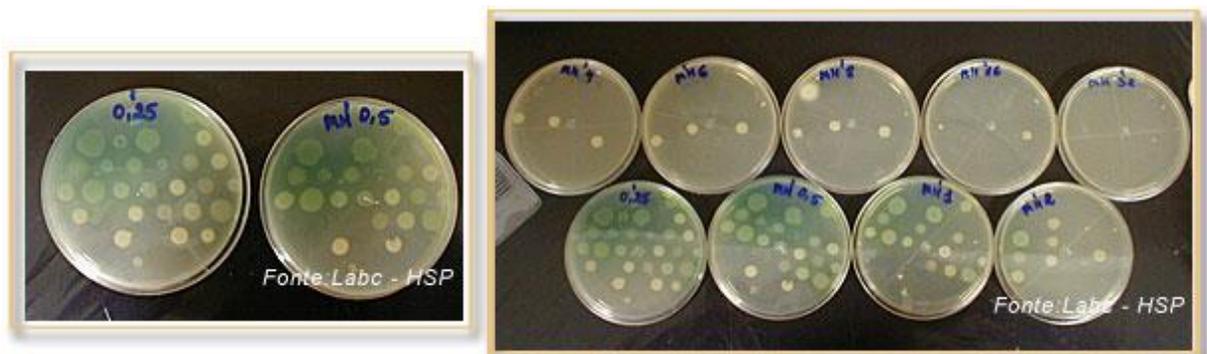


Fig. 18. Fonte: Labc-HSP

9.2 Métodos quantitativos

9.2.1 Macrodiluição em caldo

- Preparar 8 ou mais concentrações do agente antimicrobiano em volume final de 1 a 2 mL por tubo
- Os tubos contendo antimicrobianos são, então, inoculados com uma suspensão bacteriana padronizada em torno de 5×10^5 unidades formadoras de colônias (UFC) por mL.

- Após o período de incubação de 16 a 20 horas, a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, dependendo do gênero bacteriano e do antimicrobiano testado, os tubos são inspecionados visualmente para evidenciar o crescimento bacteriano que se traduz em um aumento da turbidez.
- Um tubo límpido demonstra que não houve crescimento bacteriano e representa a concentração inibitória mínima (CIM), ou seja, a menor concentração de antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano. A CIM é, geralmente, expressa em microgramas / mL.

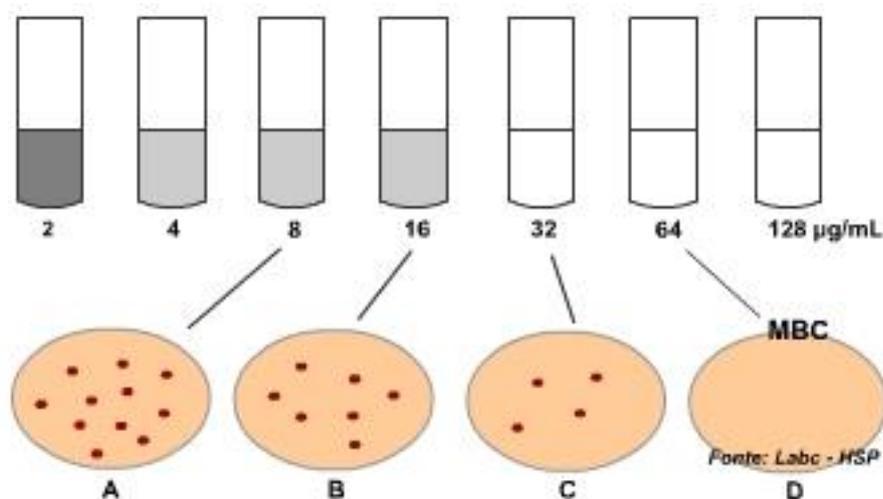


Fig. 19 - Na **Figura 1** a CIM para este antimicrobiano é de 32 µg/mL, ou seja, a menor concentração onde não se observa crescimento bacteriano. Após as diluições de 8, 16, 32 e 64 µg/mL serem inoculadas, respectivamente, nas placas de ágar A, B, C e D e incubadas por 16 horas, não houve crescimento de colônias na placa “D”, determinando-se que a concentração bactericida mínima (CBM) é de 64 µg /mL. Fonte: Labc-HSP

9.2.2 Microdiluição em caldo

- A técnica de microdiluição em caldo corresponde à miniaturização da técnica de macrodiluição..
- Em vez da utilização de diversos tubos contendo meio de cultura e antimicrobiano, a técnica de microdiluição em caldo utiliza **placas plásticas estéreis**, com 96 poços, com o fundo em formato de “U”, para permitir melhor visualização do crescimento bacteriano.
- Nesta placa, um número variável de antimicrobianos, em torno de 12 drogas, é colocado em distintas concentrações (4 a 8 diluições logarítmicas).

- As placas de microdiluição podem conter o antimicrobiano liofilizado ou congelado, e são inoculadas com o auxílio de um dispositivo plástico com o propósito de obter-se uma concentração bacteriana final de aproximadamente 5×10^4 - 10^5 UFC/mL por poço da placa de microdiluição.
- Os painéis de microdiluição devem permanecer incubados a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 16 a 20 horas (dependendo do gênero bacteriano e do antimicrobiano testado).
- Após a incubação, a leitura da placa, com a determinação da CIM, será realizada visualmente, de preferência com o auxílio de um espelho parabólico, que amplifica a imagem e facilita a leitura.



Fig. 20. Teste de microdiluição em caldo para polimixina B com concentrações de 16 $\mu\text{g/mL}$ (A) a 0.125 $\mu\text{g/mL}$ (G) cada coluna possui um microrganismo. Ex.: coluna 11 - *Pseudomonas aeruginosa* com CIM 0,5 $\mu\text{g/mL}$. Fonte: Labc-HSP

REFERÊNCIAS

Marco Antonio Hungaro Duarte Flaviana Bombarda de Andrade Sergio P. Marcondes Cyntia Estrela Carlos Estrela. Análise antibacteriana de materiais odontológicos. In: Estrela, Carlos. Metodologia Científica: Ciência, Ensino, Pesquisa (Página 549 a 557).

Baker JL, Bor B, Agnello M, Shi W, He X. Ecology of the Oral Microbiome: Beyond Bacteria. Trends Microbiol. 2017 May;25(5):362-374. doi: 10.1016/j.tim.2016.12.012. Epub 2017 Jan 11. Review. PubMed PMID: 28089325; PubMed Central PMCID: PMC5687246.

Denise M. Palomari Spolidorio Renata Serignoli Francisconi Patricia Milagros Maquera Huacho Caroline Coradi Tonon Ester Alves Ferreira Bordini Luís Carlos Spolidorio. Ensaio para formação e avaliação de biofilmes. in: Estrela, Carlos. Metodologia Científica: Ciência, Ensino, Pesquisa (Página 561 a 569).

Estrela, Carlos. Metodologia Científica: Ciência, Ensino, Pesquisa (Página 195 a 221).

Lamont RJ, Koo H, Hajishengallis G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. Nat Rev Microbiol. 2018 Dec;16(12):745-759. doi: 10.1038/s41579-018-0089-x. Review. PubMed PMID: 30301974; PubMed Central PMCID: PMC6278837.

Handbook of Culture Media for Food Microbiology, J.E.L. Corry et al. 9 ed Elsevier Science B.V. 2003

Lakshman Samaranayake. Essential microbiology for dentistry. 4 ed. New York. Churchill Livingstone; 2012

<http://www.homd.org/>

Koneman EW. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2001.

Tomitsuka Syb - Associação entre sangramento gengival interproximal com fricção do fio dental e fluido gengival em adultos sem histórico de periodontite – Monografia para

graduação no curso de Odontologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM-RS), 2016.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia. 6. ed. São Paulo: Artes Médicas; 2000.

http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_4_2004.pdf

<http://www.ufjf.br/microbiologia/files/2013/05/ROTEIRO-PARA-AULAS-PR%C3%81TICAS-bacteriologia-2018-vers%C3%A3o-02-2018.pdf>

http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo5/microdilui%C3%A7%C3%A3o.htm