

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA E DESENVOLVIMENTO
REGIONAL – CTDR
LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA

LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA: NORMAS GERAIS
DE SEGURANÇA E INSTRUÇÕES DE TRABALHO

João Pessoa, Março 2015.

Elaborado por: Larissa Raphaela G. de Farias Feitosa

Polyana Barbosa da Silva

Wilma C de Freitas

Revisado por: Prof. Solange Maria de Vasconcelos

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	4
2.	REGRAS GERAIS	4
2.1	PRINCIPAIS NORMAS DE SEGURANÇA EM LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA	6
2.2	LIMPEZA/DESINFECÇÃO DO LABORATÓRIO	6
3.	MATERIAIS USADOS NO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA	7
3.1	VIDRARIAS	7
3.2	ALGUNS EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA	11
4.	SOLUÇÕES	14
5.	LIMPEZA E DESCONTAMINAÇÃO DE VIDRARIAS	13
6.	MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO	15
7.	PRIMEIROS SOCORROS EM LABORATÓRIO	15
8.	PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS APLICADOS A ALGUNS EQUIPAMENTOS DISPONÍVEIS NO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA	25
9.	PREPARO DE MATERIAL PARA ANÁLISE	28
10.	PROCEDIMENTOS DE ANÁLISE	29
11.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
12.	ANEXO	44

1. INTRODUÇÃO

Todo e qualquer trabalho a ser desenvolvido dentro de um laboratório apresenta riscos físico, químico, mecânico e, especificamente no caso de um laboratório de microbiologia, risco biológico, o que pode resultar em danos materiais ou acidentes pessoais. Assim, as condições de limpeza e higienização devem ser aplicadas de maneira rigorosa, visando evitar possíveis fontes de contaminações, que constituam um risco em potencial para todos os envolvidos no trabalho, assim como para o próprio trabalho em si.

Com o objetivo de evitar e/ou minimizar os riscos, elaborou-se o presente Manual, no qual estão descritas as Normas de Segurança e Instruções de Trabalho, aplicado ao Laboratório de Microbiologia do Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional-CTDR da Universidade Federal da Paraíba.

Espera-se que o trabalho realizado com **cautela, dedicação e bom senso**, seguindo as recomendações aqui descritas, irá ajudar na prevenção e/ou minimização dos efeitos que possam causar possíveis acidentes.

2. NORMAS GERAIS

2.1 PRINCIPAIS NORMAS DE SEGURANÇA EM LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA

1. Apenas é permitida a entrada de pessoas **autorizadas** no laboratório;
2. Nunca trabalhar sozinho no laboratório. É conveniente fazê-lo na presença do técnico de laboratório e/ou professor;
3. Usar jaleco de mangas compridas, sempre que estiver dentro do laboratório, mesmo que não esteja trabalhando;
4. Não circular no ambiente externo ao laboratório com o jaleco;
5. Utilizar os equipamentos de proteção individual (luvas, touca, máscara, etc.) de acordo com a orientação do professor, técnico e/ou monitor;
6. Não é permitido beber, comer, fumar ou aplicar cosméticos dentro do laboratório;
7. Utilizar roupas e calçados adequados que proporcionem maior segurança, tais como: calça comprida e sapato fechado (não sendo permitido o uso de sapatilhas);
8. Tomar cuidado com os cabelos, mantendo-os presos e/ou usar touca;
9. Antes de começar as atividades de pesquisa, **o orientador deve informar ao coordenador e aos técnicos**, que tipo de micro-organismos será (ão) manipulado(s) e instruir o orientando

sobre os procedimentos de segurança, grau de risco do(s) micro-organismo(s) que será(ão) estudado(s) e a patogenicidade deste(s);

10. Em caso de **manipulação de bactérias patogênicas** (risco 2, risco 3 ou risco 4) **o aluno que está executando a pesquisa e/ou participando de aula prática deverá receber treinamento adequado**, sendo este realizado no Laboratório de Microbiologia do CTDR. Portanto, cabe exclusivamente ao **professor/orientador verificar se os procedimentos estão sendo seguidos de forma correta, conforme o treinamento recebido**.

11. Ler sempre o procedimento experimental com a certeza de ter entendido todas as instruções. Em caso de dúvidas, ou se algo anormal tiver acontecido, chamar o professor, técnico ou monitor imediatamente;

12. Para utilizar os produtos químicos ou qualquer equipamento, é necessário auxílio e autorização de professores, técnicos ou monitores;

13. Manter o local de trabalho sempre limpo, evitando obstáculos que possam dificultar as análises;

14. Não trabalhar com material imperfeito, principalmente vidros que tenham arestas cortantes. Todo material quebrado deve ser desprezado;

15. Todo material deve ser identificado;

16. Utilizar óculos de segurança quando se fizer necessário;

17. Usar luvas apropriadas durante a manipulação de objetos quentes e de substâncias que possam ser absorvidas pela pele (meios de cultura, corrosivas, irritantes, cancerígenas, tóxicas ou nocivas);

18. Caso o manipulador apresente alguma ferida exposta, esta deve estar devidamente protegida;

19. Em caso de acidentes, avisar imediatamente ao professor, técnico ou monitor responsável;

20. Cada equipe é responsável pelo seu material, portanto, ao término do trabalho, **tudo o que foi utilizado deverá ser limpo** e guardado em seus devidos lugares;

21. Quando houver quebra ou dano de materiais ou aparelhos, comunicar imediatamente aos professores, técnico ou ao monitor responsável;

22. Não fazer uso de materiais ou equipamentos que não fazem parte da aula prática;

23. Não se deve promover brincadeiras no laboratório;

24. O laboratório é local de trabalho sério e não fuga de aulas teóricas, por isso desenvolva a responsabilidade e o profissionalismo;

25. O não cumprimento destas normas poderá acarretar punição ao aluno ou à equipe;

26. Em caso de acidentes provocados por respingos, quebras de frascos, tubos e placas que contenham materiais contaminados, deve-se proceder imediatamente à desinfecção;
27. Todo material contaminado antes de ser lavado, deve passar pelo processo de esterilização, para que toda a sua flora microbológica seja completamente destruída;
28. Nunca se deve deixar sobre a bancada de trabalho, lâminas retiradas do microscópio. Este material deve ser colocado em recipiente contendo uma solução de álcool 70%;
29. Todo material contaminado deve ser guardado na geladeira de material contaminado para posteriormente ser esterilizado e lavado (tubos, pipetas, placas, frascos, etc.);
30. As alças e as agulhas, após o uso, devem ser esterilizadas à chama;
31. Soluções químicas devem ser pipetadas com auxiliar de pipetagem (como a pêra de borracha) e as pipetas químicas devem estar separadas das microbiológicas;
32. Periodicamente, a autoclave deve ser inspecionada e verificada quanto à eficiência de esterilização.

Observações:

1. O computador do laboratório é de uso exclusivo dos técnicos e professores;
2. Os materiais poderão ser emprestados, somente com a autorização do coordenador do laboratório ou técnico, mediante assinatura em livro de ocorrência.

2.2 LIMPEZA/DESINFECÇÃO DO LABORATÓRIO

Tem por objetivo eliminar qualquer interferência externa que possa influir na qualidade dos trabalhos desenvolvidos, assim como proteger o pessoal envolvido de qualquer contaminação ambiental.

2.2.1 Bancadas

No início e término de cada trabalho prático, a superfície da bancada deve ser desinfetada. Podem ser usadas soluções de álcool 70% (v/v) ou solução de hipoclorito de sódio 2,5% (v/v).

2.2.2 Piso

O piso do laboratório de Microbiologia deve ser esfregado todos os dias, com pano molhado em um desinfetante e ser lavado pelo menos uma vez na semana.

2.2.3 Funcionários/professores/alunos

Deve-se ter sempre o cuidado de lavar e realizar a antissepsia das mãos e antebraços, antes e após o término dos trabalhos realizados no laboratório. Para isso faz-se o uso de detergente apropriado e aplicação álcool 70%.

3. MATERIAIS USADOS NO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA

Esses materiais podem ser enumerados da seguinte forma:

Conjunto de uso do Aluno (a)

- Vidrarias
- Acessórios
- Equipamentos

Faz-se necessário conhecer suas utilidades, características específicas e seu manuseio, para utilizá-los de maneira correta no controle microbiológico.

Cada aluno deve portar:

- uma bata (avental/ jaleco);
- uma caneta marcadora para vidraria (caneta para retroprojektor pode substituir);
- um auxiliar de pipetagem (pêra de borracha, pipetador pi-pumb ou pipetador automático); e
- um caderno de laboratório para anotações dos experimentos.

Observações:

1. A bata não deve ser de material semi-sintético (bastante inflamável) e sim de algodão.
2. Na etapa de aprendizado o aluno deve preferir bata de manga curta, para evitar risco de acidentes com a chama do bico de Bunsen.

3.1 VIDRARIAS

Tubo de cultura

São tubos de vidro, sem borda ou com tampa de plástico rosqueável. Seu tamanho pode variar de acordo com o trabalho a ser realizado. São utilizados no cultivo de micro-

organismos em pequeno volume de meio de cultura, trazendo a vantagem de economizar meio e espaço físico.

Placas de Petri

São recipientes de formato circular, de vidro ou plástico, com tampa rasa. Geralmente é recomendado determinar-se o seu diâmetro e altura, de acordo com o tipo de trabalho a ser realizado. As mais usadas medem cerca de 100 mm de diâmetro por 10 mm de altura. Servem para conter meios de cultura sólidos. Sua superfície extensa facilita o isolamento de espécies microbianas distintas.

Pipetas graduadas (sorológicas)

São utilizadas para diluições, inoculações, distribuições de meio, etc. Em microbiologia estas pipetas devem ser esterilizadas com uma porção de algodão hidrófobo na parte superior. As pipetas para uso com substâncias químicas devem ser separadas das microbiológicas (usar auxiliar de pipetagem de 3 vias). As pipetas microbiológicas são usadas com dispensadores automáticos.

Pipetas de Pasteur

São tubos de vidro ou polipropileno, não graduados, estirados em capilar. Servem para transferência de pequenos volumes de líquidos. Podem ser usadas com uma pequena pês de borracha na extremidade superior.

Alça de Drigalski

É obtida pela manipulação de um bastão de vidro à chama do maçarico. Serve para espalhar suspensões de micro-organismos na Placa de Petri contendo meio de cultura sólido. Deve ser flambada à chama antes e após o uso.

Lâminas de vidro

São de vidro claro e transparente, com formato retangular. São utilizadas para exame de micro-organismos em microscópio óptico. Geralmente são armazenadas em caixa de vidro contendo álcool 95%.

Lâminas escavadas

São lâminas específicas, que servem ao chamado “ensaio em gota pendente”, ou seja, o material é observado suspenso em uma gota de líquido. Muito utilizadas na observação da mobilidade dos micro-organismos.

Lamínulas

São pequenas lâminas de vidro transparente, quadradas, finas, destinadas a cobrir as preparações contidas nas lâminas, nos ensaios a fresco. Também são usadas para o preparo de lâminas fixadas para uso por longos períodos.

Hematocítômetro de Newbauer

Também denominada lâmina de contagem ou câmara de Newbauer. São escavadas, milimetradas e permitem contar o número de células contidas em um volume determinado de suspensão microbiana.

Frascos de Cultivo Microbiano

De vidro borossilicato e tampa rosqueada de polipropileno, autoclavável. São vidrarias utilizadas para análises de água e alimentos.

Tubos de Durhan

São tubos de vidro pequenos e cilíndricos. Servem para captar o gás formado em uma fermentação.

Termômetros

São utilizados em estufas microbiológicas, de secagem e esterilização, banhos de água (banhos-maria), etc. Deve-se prezar por termômetros calibrados pela Rede Brasileira de Calibração – RDC (INMETRO), cujas incertezas sejam conhecidas. Deve-se dar preferência a termômetros de álcool (bulbo vermelho).

Balão de fundo plano (chato) e Erlenmeyer

São utilizados em Microbiologia para armazenar quantidades maiores de meio de cultura. O erlenmeyer é uma vidraria muito utilizada também na multiplicação celular de micro-organismos em meio de cultura líquida com agitação ou aeração.

Bico de Bunsen

É um aquecedor a gás com chama, cuja temperatura varia de acordo com a regulagem. É suprido com gás liquefeito de petróleo (GLP) e proporciona uma chama que permite a realização da manipulação das análises microbianas. Deve-se verificar com frequência se não há vazamentos de gás nas conexões.

Cabo de Kolle

É um cilindro metálico, contendo um material isolante térmico na extremidade, usado para manipulação microbiana da alça de platina (ou níquel-cromo). Na outra extremidade metálica há um orifício onde é colocada a alça ou agulha que são fixadas mediante encaixe rosqueável, utilizado como suporte para este fim.

Alça de Platina e Agulhas

A alça é um fio de platina ou outra liga metálica, medindo aproximadamente cinco centímetros, recurvado em uma de suas extremidades. É adaptado ao cabo de Kolle. Este material é utilizado para transferir inóculos sólidos ou em suspensão. A agulha é um fio de platina ou de outra liga, que fixado ao cabo de Kolle, é utilizada para semear meio sólido em profundidade.

Espátulas e pinças

Estes utensílios são normalmente produzidos em aço inoxidável. A espátula é utilizada para pesagem de pequenas massas, enquanto a pinça, para a manipulação de lâminas, lamínulas, etc.

3.2 ALGUNS EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA

Agitador do tipo rotatório (Shaker)

É munido de uma plataforma onde os recipientes contendo o meio líquido são fixados. O mesmo gira de modo circular, agitando o meio continuamente durante a incubação e também expondo maior superfície do meio à fase gasosa.

Contador de colônias

É utilizado para contagem de colônias em Placa de Petri. É constituído de um suporte onde é colocada a placa e acima desta, em distância definida, situa-se uma lente (lupa) que possibilita o aumento de 1,5 vezes. Pode acompanhar uma caneta para contagem. Quando o equipamento está funcionando, a placa é iluminada, permitindo assim maior nitidez e realce das linhas que subdividem o suporte.

Estufa incubadora (Microbiológica)

É um tipo específico de estufa que apresenta além da porta metálica, uma porta de vidro. Apresenta um sistema de aquecimento controlado por resistência elétrica. O aquecimento é controlado através de um termostato e a temperatura acompanhada com termômetro analógico ou digital.

A temperatura não deve ter uma variação superior à $\pm 0,5$ °C. Para determinar a temperatura, coloca-se um termômetro com o bulbo submerso em líquido (glicerina, água, etc.) para maior homogeneidade da medida.

Esse equipamento é utilizado como auxiliar no crescimento e reprodução dos microorganismos, uma vez que fornece a temperatura adequada a cada espécie microbiana.

Incubadora de banho de água (banho-maria)

É um equipamento indispensável para realizações dos ensaios de coliformes termotolerantes ($44,5 \pm 0,2$ °C). O mesmo é dotado de um termômetro, termostato e tampa para o controle de temperatura do banho.

Estufa de Esterilização

É um tipo específico de estufa que apresenta um sistema de aquecimento controlado por resistência elétrica. É munida de termostato e termômetro para o controle de temperatura. Em geral este equipamento é utilizado para esterilizar vidrarias.

Potenciômetro

É um equipamento muito utilizado no laboratório de Microbiologia para se determinar o pH dos diferentes tipos de meios de cultura e soluções tampão. É constituído por eletrodos, botões de ajuste e é dotado de um sistema eletrônico capaz de fornecer leituras diretas com exatidão de $\pm 0,1$ unidades de pH. Verifica-se a exatidão do aparelho pelo menos duas vezes ao dia, usando-se soluções-padrão tamponadas.

Balanças

São destinadas a pesagens das diferentes substâncias usadas no preparo dos vários tipos de meios de cultura, soluções e corantes. Podem ser analógicas ou digitais. As balanças devem ser mantidas sobre uma base sólida protegida de vibrações, e também de umidade e mudanças bruscas de temperatura.

Autoclave

É um equipamento destinado à esterilização pelo calor úmido (vapor d'água sob pressão). Normalmente, são utilizados para esterilizar águas de diluições, meios de cultura que suportem temperaturas elevadas (115 – 120 °C), materiais contaminados que vão ser descartados e outros. A autoclave de laboratório pode ser do tipo horizontal ou vertical, contendo os seguintes acessórios: caldeira cilíndrica hermeticamente fechada por uma tampa de bronze ou cobre, dotada de manômetro, válvula de escape de ar e de segurança. Em seu interior existe uma cesta metálica (móvel) onde são colocados todos os materiais a serem esterilizados.

Sensor de Eletrodo de Temperatura

É empregado o uso de bioindicadores ou fitas de controle para se testar a eficiência deste equipamento.

Geladeiras e Congeladores (Freezers)

As geladeiras são utilizadas para a conservação de meios de cultura estéreis, soluções e amostras de contra-prova. As culturas microbianas e soluções não devem ser colocadas no mesmo equipamento que as amostras. Jamais poderá guardar refeições, lanches, bebidas ou qualquer outro alimento que irá ser consumido. Se contiver material com risco biológico deverá ser identificada com opictograma adequado. Culturas vivas não devem ser congeladas.

Agitador Magnético

É munido de uma plataforma metálica onde o recipiente contendo o meio líquido e uma barra magnética revestida de material inerte é colocado. O mesmo gira a barra magnética de modo circular, agitando o meio continuamente durante a incubação e também expondo maior superfície do meio à fase gasosa.

Microscópio Óptico

Equipamento utilizado para o estudo dos micro-organismos. Os equipamentos mais usados permitem o aumento de até 1.250 vezes e podem ser monocular ou binocular. Deve-se ter cuidado para não utilizar preparações a fresco com a objetiva de imersão.

Auxiliar de Pipetagem

Equipamento utilizado para pipetar líquidos viscosos tais como meios de cultura e culturas microbianas. As pipetas devem ter uma proteção de algodão hidrófobo para proteger o auxiliar de possíveis contaminações.

Cabines de Fluxo Laminar Horizontal e Vertical

As cabines de fluxo horizontal se destinam à manipulação de materiais estéreis como meios de cultura esterilizados e amostras de materiais estéreis (soluções injetáveis, nutrição parenteral, etc). Não devem ser usadas para materiais muito contaminados ou culturas puras de micro-organismos, pois o fluxo é direcionado no sentido do operador.

4. SOLUÇÕES

Soluções Desinfetantes

As soluções desinfetantes são utilizadas para anti-sepsia das mãos (álcool 70% v/v), ou desinfecção das bancadas (hipoclorito de sódio 2,5% v/v ou álcool 70% v/v), ou ainda para descarte de resíduos líquidos e de pipetas contaminadas (não usar solução inflamável com álcool 70%).

As soluções podem ser armazenadas em pissetas plásticas.

Soluções Corantes

As soluções corantes são utilizadas para preparação de micro-organismos para a observação microscópica.

5. LIMPEZA E DESCONTAMINAÇÃO DE VIDRARIAS

Para a limpeza de vidrarias em uso corrente, as seguintes etapas devem ser executadas:

- Os materiais quando novos e também os usados (previamente esterilizados), porém sem elevada contaminação, são lavados com solução detergente e passados sob água corrente (5 a 8 enxágues). Em seguida são enxaguados com porções pequenas de água destilada (3 enxágues). Deixa-se escorrer, coloca-se em estufa com uma temperatura controlada em torno de 80 °C para secagem.
- Materiais usados em análises e culturas microbianas, isto é, com culturas desenvolvidas e que vão ser descartadas, devem ser autoclavadas durante 30 minutos, a uma temperatura de 121 °C. Desta forma, ficam isentos de contaminações e são manuseados sem risco de contaminar o operador, as pias e materiais de limpeza.

Após a esterilização do material contaminado, os meios de cultura ainda não solidificados são colocados no lixo comum e a vidraria lavada com água corrente e deixada durante 12 horas em solução de detergente.

- Lâminas e lamínulas quando retiradas do microscópio são colocadas em uma solução desinfetante (hipoclorito de sódio) e deixadas submersas por 24 horas antes de serem lavadas com água corrente e com água destilada. Após a limpeza são acondicionadas em frascos com boca larga contendo álcool 96 °GL.

6. MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO

Na esterilização em estufa, o material deve permanecer a 170 °C e, na esterilização em autoclave, a 121 °C por 15 minutos para esterilização de material não contaminado e 30 minutos para material contaminado. Não trabalhar com as estufas ou autoclaves muito cheias, para facilitar a transferência de calor.

As vidrarias devem ser esterilizadas em estufa, para que o material encontre-se completamente seco e pronto para uso.

Observação:

Pipetas com capacidade menor do que 1,0 ml nunca devem ser esterilizadas em estufas, pois as altas temperaturas provocam alterações significativas nas medidas de volume. O procedimento correto é esterilizar em autoclaves a 121 °C, por não mais do que 15 minutos.

Todos os tubos de ensaio, frascos e estojos devem ser esterilizados com tampas afrouxadas ou ligeiramente abertas. Após o término da esterilização essas tampas devem, então ser completamente fechadas.

Na esterilização de vidraria vazia em autoclave, é recomendado liberar o vapor imediatamente após o término do tempo de esterilização, através da válvula de descarga de vapor. Esse cuidado diminui o acúmulo de condensado e facilita a secagem do material.

7. PRIMEIROS SOCORROS EM LABORATÓRIO

É muito importante que sejam conhecidos os procedimentos de segurança que devem ser usados quando ocorrem determinados acidentes. Por esse motivo serão enumerados a seguir, os acidentes que podem ocorrer com maior frequência em laboratórios e quais as providências que devem ser tomadas imediatamente.

É de vital importância conhecer a localização das pessoas e equipamentos necessários quando o acidente exigir assistência especializada. Números de telefones como os de ambulância, bombeiros, posto médico, hospital e médico mais próximos, devem estar visíveis e facilmente acessíveis ao responsável pelo laboratório.

Queimaduras

Pessoas com queimaduras profundas podem correr sério risco de vida. Quanto maior a extensão, maiores os perigos para a vítima. Existem diferentes graus de lesão. Deve-se levar em consideração que uma pessoa pode apresentar, ao mesmo tempo, queimaduras de terceiro, segundo e primeiro graus - e cada tipo de lesão pede um socorro específico.

É proibido passar gelo, manteiga ou qualquer coisa que não seja água fria no local, em qualquer caso.

Não se deve estourar bolhas ou tentar retirar a roupa colada à pele queimada.

- Primeiro grau

As queimaduras deste tipo atingem apenas a epiderme, que é a camada mais superficial da pele. O local fica vermelho, um pouco inchado, e é possível que haja um pouco de dor. É considerada queimadura leve, e pede socorro médico apenas quando atinge grande extensão do corpo.

1. Usar água, muita água. É preciso resfriar o local. Isso deve ser feito com água corrente, um recipiente com água fria ou compressas úmidas. Não usar gelo.
2. Depois de cinco minutos, quando a vítima estiver sentindo menos dor, secar o local, sem esfregar.
3. Com o cuidado de não apertar o local, fazer um curativo com uma compressa limpa.
4. Em casos de queimadura de primeiro grau - e apenas nesse caso - é permitido e recomendável beber bastante água e tomar um remédio que combata a dor.

- Segundo grau

Já não é superficial: epiderme e derme são atingidas. O local fica vermelho, inchado e com bolhas. Há liberação de líquidos e a dor é intensa. Se for um ferimento pequeno, é considerada queimadura leve. Nos outros casos, já é de gravidade moderada. É grave quando a queimadura de segundo grau atinge rosto, pescoço, tórax, mãos, pés, virilha e articulações, ou uma área muito extensa do corpo.

1. Usar água, muita água. É preciso resfriar o local. Para isso deve-se utilizar água corrente, um recipiente com água fria ou compressas úmidas. Não usar gelo.
2. Depois de cinco minutos, quando a vítima estiver sentindo menos dor, secar o local, sem esfregar.
3. Com o cuidado de não apertar o local, fazer um curativo com uma compressa limpa.

Observação: Em caso de ocorrência de queimadura de segundo grau, levar o acidentado imediatamente ao hospital.

- Terceiro grau

Qualquer caso de queimaduras de terceiro grau é grave: elas atingem todas as camadas da pele, podendo chegar aos músculos e ossos. Como os nervos são destruídos, não há dor - mas a vítima pode reclamar de dor devido a outras queimaduras, de primeiro e segundo grau, que tiver. A aparência deste tipo de ferimento é escura (carbonizada) ou esbranquiçada.

1. Retirar acessórios e roupas, porque a área afetada vai inchar. Atenção: se a roupa estiver colada à área queimada, não mexer!
 2. É preciso resfriar o local. Fazer isso com compressas úmidas. Não usar gelo.
 3. Nas queimaduras de terceiro grau pequenas (menos de cinco centímetros de diâmetro) - só nas pequenas! - pode-se usar água corrente ou um recipiente com água fria.
Cuidado com o jato de água - ele não deve causar dor nem arrebentar as bolhas.
- ATENÇÃO!** A pessoa com queimadura de terceiro grau pode não reclamar de dor e, por isso, se machucar ainda mais - como dizer que o jato de água não está doendo, por exemplo.
4. Se a queimadura tiver atingido grande parte do corpo, deve-se ter o cuidado de manter a vítima aquecida.
 5. Com o cuidado de não apertar o local, fazer um curativo com uma compressa limpa. Em feridas em mãos e pés, evitar fazer o curativo você mesmo, porque os dedos podem grudar um nos outros. Espere a chegada ao hospital.
 6. Não oferecer medicamentos, alimentos ou água, pois a vítima pode precisar tomar anestesia e, para isso, necessita estar em jejum.
 7. Não perder tempo em remover a vítima ao hospital. Ela pode estar tendo dificuldades para respirar.

Observação: Em caso de ocorrência de queimadura de terceiro grau, levar o acidentado imediatamente ao hospital.

Ferimentos com materiais perfuro cortantes e fraturas

Se a hemorragia decorrente de um ferimento qualquer é intensa, deve ser interrompida imediatamente. O estancamento de hemorragia pode ser feito aplicando-se uma compressa ao ferimento com pressão direta. Se for possível, o local afetado deve ser elevado até que se controle a hemorragia.

Tratando-se de corte leve, a hemorragia não é grande. Nestes casos, deve-se remover todo material estranho que se encontre no ferimento, lavando-se cuidadosamente a região com sabão e água corrente e limpa. A seguir, deve ser aplicado anti-séptico em todas as partes do ferimento até aproximadamente 2 cm da pele ao redor do corte. Não se deve nunca remover materiais estranhos que estejam muito profundos nos ferimentos. Em todos os tipos de ferimentos as bandagens devem ser firmes, nunca apertadas.

Em casos de ferimentos por perfuração a vítima deve ser enviada a um hospital, pois há perigo da existência de materiais estranhos no corte e a impossibilidade de se alcançar o fundo do ferimento com anti-sépticos.

Sintomas como dor, inchaço e deformação são típicos em casos de fraturas. A vítima não deve ser removida do local do acidente a menos que vapores, fumaça ou fogo assim o determinem. Os ossos fraturados devem ser mantidos imóveis, assim como as juntas adjacentes. A hemorragia e o estado de choque devem ser tratados. Quando se torna absolutamente necessário o transporte da vítima deve ser improvisado uma tala suporte para impedir que a fratura se agrave durante o trânsito.

Deve ser utilizado material rígido, almofada ou cobertor para apoiar a região e entalar como estiver.

Intoxicação por gases ou vapores

O socorrista deve tomar todas as precauções, como o uso dos devidos equipamentos de proteção individual, para entrar na área do acidente.

1. Remover o acidentado do local do acidente para local arejado e afrouxar as vestes, principalmente próximas ao pescoço.
2. Manter o acidentado deitado e moderadamente aquecido.
3. Praticar respiração artificial boca-a-boca, a não ser que se trate de substâncias do tipo gás cloro, SO₂, inalado para os pulmões.
4. Aplicar ressuscitação cardiorespiratória, se necessário.
5. Solicitar assistência médica urgente.

Ingestão oral de agentes químicos

Normalmente, quando certas soluções são ingeridas deve-se induzir o vômito. A melhor maneira para provocá-los é a excitação mecânica da garganta. Em alguns casos, o vômito não deve ser provocado, como nas intoxicações em consequência da ingestão de substâncias cáusticas e derivados de petróleo.

1. Conservar o corpo aquecido pela aplicação de cobertores. Evitar calor externo.
2. Guardar o tóxico suspeito no recipiente original e colocar qualquer material vomitado num recipiente limpo. Levar os espécimes, com o paciente, para possível identificação.
3. Providenciar assistência médica imediata.

Choques elétricos

A vítima que sofreu um acidente por choque elétrico **não deve ser tocada até que esteja separada da corrente elétrica**. Esta separação deve ser feita empregando-se luva de borracha especial. A seguir deve ser iniciada imediatamente a respiração artificial, se necessário. A vítima deve ser conservada aquecida com cobertores ou bolsas de água quente.

Estado de choque

O estado de choque pode ocorrer em todos os casos de lesões graves ou hemorragias. Existem outras situações que podem causar estado de choque, como queimaduras e ferimentos graves ou extensos, esmagamentos, perda de sangue, acidentes por choque elétrico, envenenamento por produtos químicos, ataque cardíaco, exposição a extremos de calor ou frio, dor aguda, infecções, intoxicações alimentares e fraturas. A gravidade do choque varia de indivíduo para indivíduo, podendo às vezes provocar a morte.

Alguns sintomas facilmente reconhecíveis caracterizam bem o estado de choque, assim como palidez com expressão de ansiedade; pele fria e molhada; sudação na fronte e nas palmas das mãos; náusea e vômitos; respiração ofegante, curta rápida e irregular; frio com tremores; pulso fraco e rápido; visão nublada e perda total ou parcial de consciência. Diante desse quadro, enquanto se espera a chegada do recurso médico ou se providencia o transporte, a vítima, depois de rapidamente inspecionada, deve ser colocada em posição inclinada, com a cabeça abaixo do nível do corpo. A causa do estado de choque deve ser combatida, evitada ou contornada, se possível. No caso de ter sido provocada por hemorragia, controle-a imediatamente.

A roupa do acidentado deve ser afrouxada no pescoço, no peito e na cintura e retirada da boca dentaduras, gomas de mascar, etc. O aparelho respiratório superior da vítima deve ser conservado totalmente desimpedido. Caso a vítima vomite, sua cabeça deve ser virada para o lado. As pernas do acidentado devem ser elevadas, caso não haja fratura. Mantenha-o agasalhado, utilizando cobertores e mantas. Se não houver hemorragia, as pernas e os braços devem ser friccionados para restauração da circulação.

Não devem ser ministrados: estimulantes, até que a hemorragia esteja controlada; bebidas alcoólicas, em nenhuma hipótese; líquidos a uma pessoa inconsciente ou semi-consciente; ou líquidos, caso suspeite de uma lesão abdominal.

Respiração ausente

Ao socorrer um acidentado cuja respiração esteja ausente, irregular ou com muito esforço, será necessária a respiração artificial. O objetivo da respiração artificial é desobstruir e manter livres as vias respiratórias, provocando o aumento e a diminuição do volume torácico.

Deve-se puxar o maxilar inferior para frente e inclinar a cabeça para trás. Fechar as narinas da vítima. Soprar ar para o interior dos pulmões pela boca da vítima. Afastar a boca e deixar a vítima respirar o ar. Repetir a operação de 15 a 20 vezes por minuto.

Incêndios e uso de extintores

Um incêndio é um processo no qual se desenrola uma reação de combustão, que para iniciar e se propagar, precisa de três componentes: energia ou calor, combustível e comburente. O comburente natural do ambiente é o oxigênio do ar. Os combustíveis podem ser materiais sólidos, tais como: tecidos, plásticos, madeiras ou produtos químicos inflamáveis.

Os acidentes mais comuns em laboratórios envolvem roupas e reagentes. Veja a seguir, portanto, os procedimentos mais utilizados para estes casos:

- Roupas em chama: evitar correr, ventilando as chamas. O método mais eficiente é tentar abafar as chamas, deitando no chão e envolvendo a pessoa com panos úmidos.
- Reagentes em chama: fechar o gás e os interruptores de todas as chapas quentes ao redor. Remover tudo que entrar em ignição.

O controle do fogo vai depender do tamanho e da espécie. Um fogo pequeno (de um líquido em um béquer, por exemplo) pode ser extinto cobrindo a abertura do frasco com um pano limpo e úmido ou pelo uso do extintor de incêndio. O fogo geralmente se extingue na ausência do ar. Para fogo maior, pode ser empregada areia seca, ou ainda utilizar extintor adequado ao fogo.

- Classificação internacional de incêndio

Dependendo do material e do combustível, os incêndios são classificados em:

- Classe A: materiais sólidos inflamáveis, tais como: madeira, papelão, chapas e tecidos;
- Classe B: líquidos inflamáveis, tais como: álcoois, cetonas e derivados do petróleo;
- Classe C: em equipamentos elétricos energizados;
- Classe D: com materiais pirofosfóricos.

Para prevenir ou extinguir um incêndio, deve-se eliminar um dos três componentes. Os extintores baseiam-se neste princípio.

Os extintores atuam por resfriamento (extintores de água) ou eliminação do oxigênio de contato com o combustível, como os extintores base de CO₂ ou espuma mecânica, que produzem um tipo de camada de proteção no local do incêndio, impedindo o contato com o oxigênio do ar e extinguindo, desta forma, as chamas.

- Tipos de extintores de incêndio

- Pó químico ou seco com carga à base de bicarbonato de sódio e monofosfato de amônia. Indicados para incêndios classe B (inflamáveis) e C (equipamentos elétricos energizados).
- Espuma mecânica age formando uma película aquosa sobre a reiguição. Indicados para incêndios classe B e classe A, **NUNCA DEVEM SER UTILIZADOS EM INCÊNDIOS CLASSE C.**
- Extintores de CO₂. Atuam recobrando o material em chamas com uma camada gasosa, isolando o oxigênio e extinguindo o incêndio por abafamento. São indicados para incêndios de classe B ou C.

- Produtos de risco

A definição inclui:

- Produtos tóxicos: por ação tóxica imediata ou mais lenta sobre o organismo e o meio ambiente;
- Produtos inflamáveis: materiais que podem pegar fogo e manter a combustão;
- Corrosivos: substâncias ácidas ou básicas que provocam queimaduras;
- Reativos: materiais que explodem ou reagem de forma violenta;
- Outros materiais, como os gases comprimidos (nitrogênio, oxigênio, entre outros) e o nitrogênio líquido.

Derramamentos acidentais de produtos químicos

Embora não sejam frequentes, algumas precauções fazem-se necessárias, principalmente quando se trabalha com produtos de alta toxidez.

Em caso de um derrame, recomenda-se:

1. Isolar a área e comunicar todos que estão no laboratório;
 2. Comunicar ao responsável pela segurança;
 3. Proteger-se com máscaras de respiração, jaleco, luvas, óculos e outros EPIs (equipamentos de proteção individual) adequados;
 4. Desligar os aparelhos, aquecedores elétricos, estufas e outros que forem necessários;
 5. Apagar as chamas;
 6. Permitir ventilação ou exaustão no ambiente;
 7. Remover com uma pá a massa resultante em sacos plásticos ou recipientes metálicos convenientes, caso o produto reaja com plástico;
 8. Providenciar a limpeza do local e deixar ventilar até não se ter mais vapores residuais no ar.
- Todo frasco de reagente deve conter no seu rótulo o boletim de garantia específico, condições de manuseio e classe de perigo.

Descarte de resíduos químicos

Assim como a produção industrial, o laboratório gera resíduos provenientes de restos de amostras analisadas, como líquidos aquosos orgânicos, sólidos, além de gases, vapores das reações, materiais cortantes e outros.

Deve-se procurar reduzir ao mínimo a geração de lixo. Cada usuário deve estar preocupado com os impactos que suas ações podem causar ao meio ambiente. Sabe-se que a agressão zero é algo impossível, no entanto, é dever de todos tomarem as devidas precauções para que o impacto ambiental seja o menor possível.

Para que os resíduos de laboratório possam ser eliminados de forma adequada, é necessário ter-se à disposição recipientes de tipo e tamanho adequados para recolhê-los.

Os recipientes coletores devem ter alta vedação e ser de material estável. Deve-se armazenar os frascos bem fechados e em local ventilado para evitar, ao máximo, danos à saúde, principalmente quando há solvente em processo de evaporação.

Procedimentos diferentes devem ser adotados para cada tipo de resíduo gerado.

- Gases ou vapores

Trabalhando corretamente, os gases ou vapores devem ser gerados dentro de capelas e, uma vez captados pelo sistema, são conduzidos pela tubulação até a atmosfera externa do laboratório.

- Descarte de líquidos

No laboratório podem ser gerados os seguintes compostos:

- Líquidos aquosos: acertar o pH entre 5 e 9, diluir e descartar no esgoto;
- Líquidos contendo fluoreto: precipitar com cálcio e filtrar. O sólido deve ser acumulado e, posteriormente, enviado para aterro sanitário. O filtrado vai para o esgoto;
- Líquidos contendo metais pesados: devem ser descartados em recipiente próprio. Estes requerem tratamentos especiais devido à alta toxicidade e rigidez da legislação vigente.

Os principais metais pesados são: arsênio, bário, cádmio, cobre, chumbo, mercúrio, níquel, selênio e zinco.

O mercúrio metálico deve ser armazenado em recipiente próprio. Em caso de derramamento de mercúrio, deve-se providenciar ventilação exaustiva na sala, usar máscaras respiratórias, óculos de proteção e luvas. Remover o mercúrio fazendo mistura com limalha ou fio de cobre. Recolher e colocar num frasco com água para evitar a evaporação. Encaminhar para empresas que fazem o processo de reciclagem.

- Borra de metais pesados

Dependendo do seu valor comercial, poderá ter os seguintes destinos:

Reciclagem no laboratório;

Venda para empresas que fazem reciclagem;

Aterro sanitário.

- Solventes orgânicos clorados e não-clorados

Os laboratórios que trabalham com solventes orgânicos não-clorados (tipo ésteres, álcoois, aldeídos e hidrocarbonetos leves) devem armazenar estes líquidos em contêineres apropriados e podem ser destinados para reciclagem em empresas que executam este trabalho.

Os solventes clorados devem ser armazenados em separado, também em contêineres especiais, pois, em caso de queima, produz fosgênio, um gás altamente tóxico que pode causar edema pulmonar como efeito retardado, 5 a 6 horas após a aspiração.

- Resíduos sólidos

São resíduos provenientes de:

Vidrarias quebradas e frascos de reagentes ou amostras;

Restos de amostras e análises;

Deve-se ter um recipiente forrado com saco plástico para armazenagem de vidros destinados à reciclagem;

Os frascos de reagentes ou produtos tóxicos devem ser lavados para evitar acidentes em depósitos de lixo;

Os resíduos sólidos de amostras podem ser:

- Sólidos de baixa toxidez: devem ser destinados à reciclagem ou aterros sanitários;
- Sólidos não-biodegradáveis tipo plástico: devem destinar-se à reciclagem ou incineração;
- Sólidos considerados perigosos de acordo com a norma NBR-10004/ ABNT (com alguma das seguintes propriedades: inflamabilidade, corrosividade, toxicidade, atogenicidade ou reatividade). Devem ser embalados e transportados com cuidados especiais a empresas especializadas pelo seu transporte.

- Descarte de resíduos biológicos

Primeiramente, deve-se identificar, de maneira correta, os materiais a serem eliminados. Pode-se fazer a seguinte divisão de categorias:

Dejetos não-contaminados

Os dejetos não-contaminados podem ser eliminados diretamente no lixo do laboratório normal (sacos plásticos pretos).

Objetos perfurantes e cortantes

Não se devem encapar as seringas hipodérmicas usadas, nem mesmo cortar ou retirar as agulhas descartáveis. As seringas e agulhas devem ser colocadas em um recipiente de paredes rígidas (DESCARTEX). Em seguida encaminhadas para empresa responsável pelo destino final do material;

O coletor deve ser colocado próximo ao local onde o procedimento é realizado para evitar que o usuário circule com os perfuro-cortantes nas mãos ou bandejas.

Material contaminado

São classificados como materiais contaminados resíduos biológicos, tais como: cultura inócua, mistura de micro-organismos, meio de cultura inoculado, vacina vencida ou inutilizada, sangue e hemoderivados.

Os dejetos contaminados deverão ser eliminados em sacos plásticos brancos leitosos, com espessura respeitando as exigências legais preconizadas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), NBR 9091 e com o símbolo de substância. Para o material contaminado, é necessária, primeiramente, sua descontaminação por meio da autoclavagem (121 °C por 30 minutos na autoclave de material contaminado), antes de qualquer limpeza ou reparo.

8. PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS APLICADOS A ALGUNS EQUIPAMENTOS DISPONÍVEIS NO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA

Autoclave

- Verificar o nível da água, e completar se necessário, até atingir o nível adequado (cobrir as resistências elétricas);
- Acondicionar o material de modo que o vapor circule livremente e sem que se encoste às paredes do cesto metálico;
- Fechar a tampa apertando cuidadosamente os parafusos diametricamente opostos, deixando aberta a válvula de escapamento de ar;
- Deixar expulsar todo o ar de seu interior. Fechar a válvula de escape de ar quando o vapor sair num jato contínuo;
- Esperar o manômetro atingir a pressão interna desejada (em geral 1,1 atm ou 1,1 kgf/cm²) o que corresponde à temperatura de 121 °C;**

-Regular o aquecimento da autoclave de modo a permanecer na temperatura desejada durante o tempo necessário (15 minutos para material não contaminado e 30 minutos para material contaminado);

-Ao término do tempo necessário, desligar o aquecimento e, com a válvula de escapamento aberta, deixar a pressão cair lentamente até o ponto zero;

-Abrir num movimento rápido a tampa e deixar escapar os vapores (**Observação:** antes de abrir, verificar se a pressão realmente atingiu o ponto zero).

-Retirar o material e esperar esfriar.

Microscópios

- Limpar o equipamento com algodão ou flanela;

- Colocar as objetivas e oculares no microscópio; (**Observação:** as oculares são colocadas encaixando-as e as objetivas são rosqueadas)

- Ligar o cabo elétrico na tomada;

- Ligar a lâmpada (lado direito) e ajustar a intensidade quando necessário;

- Colocar a lâmina no microscópio (na platina ou mesa);

- Ajustar a distância (usando o macrométrico);

- Colocar a objetiva escolhida no trajeto da luz (movimentando o revólver, 4X, 10X, 40X, 100X). (**Observação:** Ao utilizar a objetiva de 100X colocar uma gota de óleo de imersão no preparado da lâmina);

- Focalizar com o macrométrico;

- Realizar a focalização fina com o controle micrométrico;

- Movimentar toda a lâmina através dos controles coaxiais (controles nas coordenadas X e Y);

- Observar a fixação dos preparados nas lâminas e realizar suas devidas anotações;

- Após o uso do microscópio, fazer a limpeza das lentes das objetivas, oculares e mesa do mesmo, com algodão e um leve toque de álcool;

- Retirar as objetivas e oculares e guardar o equipamento e acessórios;



Os microscópios devem ser colocados em superfícies isentas de vibrações e não são recomendadas mudanças de localização.

Balança

- Verificar se a balança está nivelada, em seguida ligá-la e aguarde 15 minutos para iniciar sua pesagem.
- Ao terminar de utilizar a balança, desligue o equipamento.

Observação: Conservar a balança sempre limpa.

Destilador de água

- Abrir o registro de água;
- Ligar o destilador (os disjuntores do destilador só devem ser ligados depois que a caldeira estiver cheia de água);
- Verificar se o fluxo de água ocorre normalmente;
- Durante a destilação ficar verificando o nível de água no barrilete;
- Quando for desligar o destilador, primeiramente desligue o equipamento, aguardar até esfriar um pouco a resistência e, só em seguida fechar o registro da água).

Câmara de fluxo laminar

- Limpar as paredes internas e a superfície da área de trabalho com desinfetante (álcool 70%);
- Ligar o equipamento, verificando a voltagem a ser usada;
- Ligar a lâmpada ultravioleta (UV) por 15 minutos;

- Após o tempo determinado, desligar a UV, ligar a lâmpada fluorescente e motor;
- Iniciar as atividades;
- Após a realização das atividades, desligar a lâmpada fluorescente e motor;
- Por último realizar a limpeza das paredes internas e da superfície de trabalho com álcool 70%.

Observações:

1. A câmara de fluxo laminar deve ser higienizada antes e após os trabalhos;
2. **As lâmpadas UV devem ser ligadas pelo menos 15 minutos antes de iniciar o trabalho**, visando esterilizar o ambiente interno da câmara de fluxo. Neste caso ninguém deve permanecer no ambiente em que a luz UV atinge. No caso específico deste laboratório, deve ser evacuada toda a área em frente as câmaras de fluxo, pois as **lâmpadas UV podem causar queimaduras, são altamente mutagênicas e devem ser mantidas desligadas durante toda a realização dos trabalhos.**

9. PREPARO DE MATERIAL PARA ANÁLISE

- Placas de Petri: Devem ser acondicionadas em estojos porta-placas de aço inoxidável, em grupos de mesma dimensão, ou embrulhadas em papel kraft, em grupo de até 10 placas.
- Pipetas: Preencher o bocal com o algodão e acondicionar em estojos porta-pipetas de alumínio ou aço inoxidável, em grupos de mesma capacidade, com as pontas para baixo, na extremidade oposta à da tampa do estojo. Proteger o fundo dos estojos com um chumaço de gaze, para evitar danos às pontas das pipetas. Alternativamente, embrulhar individualmente em papel kraft, lembrando-se de identificar a extremidade do embrulho que deve ser aberta no momento da análise.
- Tubos de ensaio vazios. Tampar com tampão de algodão ou com as respectivas tampas, no caso de tubos rosqueáveis. Acondicionar em grupos, em cestas apropriadas para esse fim, lembrando-se de afrouxar as tampas dos tubos de rosca. Cobrir a parte superior dos tubos com papel kraft e amarrar com barbante.

- Frascos de homogeneização e outros frascos vazios tampados com tampão de algodão. Cobrir a tampa ou o tampão com papel kraft e amarrar com barbante, individualmente.
- Espátulas, pinças, tesouras e demais utensílios. Embrulhar individualmente em papel kraft, lembrando-se de identificar a extremidade do embrulho que deve ser aberta no momento da análise.

10. PROCEDIMENTOS DE ANÁLISE

Preparação de meio de cultura

A preparação dos meios de cultura é realizada de acordo com a instrução do fabricante (presente geralmente no rótulo das embalagens).

Coloração Simples e de Gram

Preparo do esfregaço

1. Preparo das lâminas de vidro

Lavar as lâminas com água e sabão a fim de eliminar gordura, em seguida enxaguar-las com água e manter em um recipiente com álcool a 95%. Antes da utilização, as lâminas devem ser retiradas com o auxílio de uma pinça e secas com papel toalha.

2. Preparo do esfregaço

- Para micro-organismos cultivados em meio líquido

Retirar do tubo de cultura, com auxílio de uma alça de platina, 1 a 3 gotas do meio e colocar sobre uma lâmina previamente limpa. Caso a cultura não tenha uma quantidade grande de célula, pode-se separar em um tubo de ensaio alguns mililitros da cultura, centrifugar e re-suspender em menor quantidade de meio

- Para micro-organismos em meio sólido

Colocar 1 a 2 gotas de solução salina estéril sobre a lâmina de vidro previamente limpa, recolher com a alça de platina uma pequena porção do crescimento dos micro-organismos e diluir na gota de solução salina espalhando as células com movimentos circulares.

O esfregaço deve secar completamente.

Atenção: Não assoprar sobre o esfregaço ou balançar a lâmina ao ar, pois outros micro-organismos podem contaminar a amostra.

3. Fixação pelo calor

Passar a lâmina contendo o esfregaço seco por 3 vezes sobre a chama do bico de Bunsen, fazendo com que ocorra a fixação pelo calor e evitando que os micro-organismos sejam perdidos durante a coloração e sucessivas lavagens.

Preparação a fresco

- Para suspensão bacteriana

Após flambar a alça de inoculação, colocar uma gota de suspensão bacteriana em uma lâmina e cobrir com uma lamínula. Adicionar uma gota de óleo de imersão e observar em microscópio óptico com a objetiva adequada.

- Para leveduras

Retirar com uma alça de inoculação flambada, uma porção do crescimento da levedura e suspender em uma gota da solução salina em uma lâmina. Cobrir com uma lamínula e observar ao microscópio com a objetiva adequada.

Coloração Simples

Após o preparo da lâmina, adicionar azul de metileno sobre o substrato e deixa agir por 1 a 2 minutos

Coloração de Gram

Colocar uma gota de solução salina sobre uma lâmina, em seguida, flambar uma alça e com ela retirar uma pequena porção do crescimento bacteriano. Colocar a porção sobre uma gota de solução salina e espalhar, obtendo o esfregaço. Deixar secar espontaneamente. Fixar o esfregaço à lâmina, segurando com uma pinça e passando 3 vezes sobre a chama do bico de Bunsen com a parte do esfregaço para cima.

Iniciando a coloração

1. Adicionar sobre o esfregaço gotas da solução de cristal violeta durante 1 a 2 minutos;
2. Lavar ligeiramente com água. Escorrer;
3. Cobrir o esfregaço com lugol durante 1 a 2 minutos;
4. Descorar rapidamente pelo álcool a 95%;
5. Cobrir com uma solução de safranina ou de fucsina, durante 30 segundos, para contracorar;
6. Lavar e enxugar entre dois papéis de filtro ou papel toalha, com cuidado, sem esfregar;
7. Adicionar sobre p esfregaço corado uma pequena gota de óleo de imersão e laminar ao microscópio óptico com objetiva de imersão (100x).

Interpretação dos resultados

Observar as lâminas com as bactérias coradas, distinguindo o tamanho, a forma e em relação ao Gram (roxas – Gram positiva e vermelhas ou rosadas – Gram negativas).

Contagem de Bolores e Leveduras

Baseia-se na verificação da capacidade desses micro-organismos se desenvolverem em meios de cultura com pH próximo a 3,5 e temperatura de incubação de 25 ± 1 °C. A utilização de meios acidificados a pH $3,5 \pm 0,1$ promove seletivamente o crescimento de fungos, inibindo a maioria das bactérias presentes no alimento.

Reagentes necessários

- Ágar batata glicose 2%;
- L(+) Ácido tartárico 10%;
- Solução salina peptonada 0,1%.

Preparo das placas

- Fundir o ágar batata glicose;
- Resfriar em banho-maria até $46 - 48$ °C;
- Acidificar o meio até pH 3,5 por meio da adição de 1,5 mL de solução de ácido tartárico 10% para cada 100 mL de meio;
- Verter nas placas cerca de 15 a 20 mL;
- Deixar solidificar em superfície plana;
- Identificar as placas.

Pesagem e preparo da amostra

- Pesar $25 \pm 0,2$ g ou pipetar $25 \pm 0,2$ mL da amostra;
- Adicionar 225 mL de solução salina peptonada 0,1%;
- A partir da diluição inicial 10^{-1} , efetuar as diluições desejadas;
- Inocular 0,1 mL das diluições selecionadas sobre a superfície seca de ágar batata glicose 2% acidificado a pH 3,5;
- Com o auxílio de alça de Drigalski ou bastão do tipo “hockey”, espalhar o inóculo cuidadosamente por toda a superfície do meio, até sua completa absorção.

Utilizar no mínimo duas diluições decimais ou duplicata da mesma diluição. Nos casos em que a legislação exigir valores menores que 100 UFC/g ou mL, distribuir em duplicata 1 mL da diluição 10^{-1} em 3 placas (0,4 mL, 0,3 mL e 0,3 mL). No caso de produtos líquidos poderá ser inoculado 0,1 mL diretamente da amostra (10^0), o que corresponde à diluição 10^{-1} .

- Incubar as placas, sem inverter, a 25 ± 1 °C, por 5 a 7 dias, em incubadora de B.O.D.
- Selecionar as placas que contenham entre 15 e 150 colônias.

- A partir dos dados obtidos, calcular o número de micro-organismos presentes. Expressar o resultado em UFC/g ou mL.

Observação: Não abrir, em hipótese alguma, as placas que contenham crescimento de fungos, para evitar a contaminação ambiental por meio da dispersão dos seus esporos.

Contagem de mesófilos, psicrófilos e termófilos (contagem padrão em placas de acordo com MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento)

Estabelece o procedimento para a contagem padrão de micro-organismos mesófilos, psicrófilos e termófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis. Aplica-se a amostras de matérias-primas, água e alimentos. Baseia-se na semeadura da amostra ou de suas diluições em ágar padrão para contagem seguida de incubação em temperatura de $36 \pm 1^\circ\text{C}$, $7 \pm 1^\circ\text{C}$, $45 \pm 1^\circ\text{C}$, respectivamente, por 48 horas.

Reagentes necessários

- Agar padrão para contagem (PCA);
- Solução salina peptonada 0,1%.

Pesagem e preparo da amostra

- Pesar $25 \pm 0,2$ g ou pipetar $25 \pm 0,2$ mL da amostra;
- Adicionar 225 mL de solução salina peptonada 0,1%;
- Homogeneizar por aproximadamente 60 segundos em “stomacher”. Esta é a diluição 10^{-1} .

Inoculação em placas

- A partir da diluição inicial (10^{-1}), efetuar as demais diluições desejadas em solução salina peptonada 0,1%;

Semear 1 mL de cada diluição selecionada em placas de Petri estéreis. Adicionar cerca de 15 a 20 mL de PCA fundido e mantido em banho-maria a $46 - 48^\circ\text{C}$;

- Homogeneizar adequadamente o ágar com o inoculo;
- Deixar solidificar em superfície plana.

Incubação

- Incubar as placas invertidas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas;

- Realizar a leitura selecionando as placas de acordo com o seguinte critério, contando todas as colônias presentes: Placas que contenham entre 25 e 250 colônias;
- A partir dos dados obtidos, calcular o número de micro-organismos presentes na amostra em análise, expressar o resultado em UFC/g ou mL.

Detecção de coliformes totais e termotolerantes pelo método do Número Mais Provável (NMP) e *E. coli*;

Estabelece o procedimento para a contagem de coliformes totais e coliformes termotolerantes em alimentos. Aplica-se a amostras de matérias-primas, alimentos e rações, devendo ser utilizada quando o limite máximo tolerado for igual ou superior a 100 UFC/g ou mL.

Prova presuntiva: Baseia-se na inoculação das diluições desejadas das amostras sob teste em caldo lauril sulfato triptose (tubos contendo CLST com tubos de Durhan) ou em ágar cristal violeta vermelho neutro bile (VRBA) e posterior contagem das colônias suspeitas.

O ágar cristal violeta vermelho neutro bile apresenta em sua composição sais biliares e cristal violeta, responsáveis pela inibição de micro-organismos Gram positivos e vermelho neutro, um indicador de pH que revela a fermentação da lactose pelos micro-organismos presentes. A adição de sobrecamada visa à prevenção do crescimento e do espraiamento de colônias na superfície do ágar.

Prova confirmativa para coliformes totais: A confirmação da presença de coliformes totais é feita por transferência de alçada do tubo positivo (CLST) para o meio verde brilhante (contendo também tubos de Durhan invertidos) ou por meio da inoculação das colônias suspeitas em caldo verde brilhante bile 2% lactose e posterior incubação a 36 ± 1 °C. A presença de gás nos tubos de Durhan evidencia a fermentação da lactose presente no meio. O caldo verde brilhante bile 2% lactose apresenta em sua composição bile bovina e um corante derivado do trifenilmetano (verde brilhante) responsáveis pela inibição de micro-organismos Gram positivos.

Prova confirmativa para coliformes termotolerantes: A confirmação da presença de coliformes termotolerantes é feita por transferência de alçada do tubo positivo (CLST) para o meio EC (contendo também tubos de Durhan invertidos) ou por meio da inoculação das colônias suspeitas em caldo EC e posterior incubação em temperatura seletiva de $45 \pm 0,2$ °C,

em banho-maria com agitação ou circulação de água. A presença de gás nos tubos de Durhan evidencia a fermentação da lactose presente no meio. O caldo EC apresenta em sua composição uma mistura de fosfatos que lhe confere um poder tamponante impedindo a sua acidificação. A seletividade é devido a presença de sais biliares responsáveis pela inibição de micro-organismos Gram positivos.

Reagentes

- Ágar cristal violeta vermelho neutro bile (VRBA);
- Caldo verde brilhante bile 2% lactose;
- Caldo EC;
- Solução salina peptonada 0,1%.

Pesagem e preparo da amostra

- Pesar $25 \pm 0,2$ g ou pipetar $25 \pm 0,2$ mL da amostra;
- Adicionar 225 mL de solução salina peptonada 0,1%;
- Homogeneizar por aproximadamente 60 segundos em “stomacher”. Esta é a diluição 10^{-1} .

Incubação

- Incubar os tubos a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 a 48 horas. A presença de coliformes totais é confirmada pela formação de gás (mínimo 1/10 do volume total do tubo de Durhan) ou efervescência quando agitado gentilmente;
- Anotar o resultado obtido para cada colônia, bem como a diluição utilizada.

Observação: A leitura pode ser feita após 24 horas de incubação, porém, só serão válidos os resultados positivos. Os tubos que apresentarem resultado negativo deverão ser reincubados por mais 24 horas.

Coliformes termotolerantes

- Inocular as culturas suspeitas de coliformes termotolerantes em tubos contendo caldo EC;
- Incubar os tubos a $45 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, por 24 a 48 horas em banho-maria com agitação.
- A presença de coliformes termotolerantes é confirmada pela formação de gás (mínimo 1/10 do volume total do tubo de Durhan) ou efervescência quando agitado gentilmente.
- Anotar o resultado obtido para cada tubo, bem como a diluição utilizada.

Observação: A leitura pode ser feita após 24 horas de incubação, porém, só serão válidos os resultados positivos. Os tubos que apresentarem resultado negativo deverão ser reincubados por mais 24 horas.

Para o cálculo final das contagens de coliformes totais e termotolerantes, expressar o resultado em UFC/g ou mL.

Contagem de *Staphylococcus*

Estabelece o procedimento para a contagem de *Staphylococcus aureus*. Aplica-se a amostras de matérias-primas e alimentos.

Contagem

Baseia-se na inoculação das diluições desejadas das amostras em Ágar Baird-Parker, cuja composição evidencia a habilidade desse micro-organismo de crescer na presença de 0,01 a 0,05% de telurito de potássio em combinação com 0,2 a 0,5 % de cloreto de lítio e 0,12 a 1,26% de glicina.

O *Staphylococcus aureus* reduz anaeróbia e aerobiamente o telurito de potássio, produzindo colônias negras. O Ágar Baird-Parker suplementado com solução de gema de ovo possibilita a verificação das atividades proteolítica e lipolítica do *S. aureus*, por meio do aparecimento de um halo de transparência e um de precipitação ao redor da colônia, respectivamente.

Prova da coagulase

Baseia-se na comprovação da capacidade de coagular o plasma de coelho pela ação da enzima coagulase produzida pelo micro-organismo.

Provas complementares

- Coloração de Gram: Baseia-se na verificação das características morfológicas e tintoriais do micro-organismo.

- Prova da termonuclease: Se baseia na degradação do DNA em oligonucleotídeos pela ação da enzima DNase produzida pelo micro-organismo. A reação é evidenciada pelo aparecimento de um halo de coloração rósea no Ágar Azul de Toluidina e de clarificação, quando utilizado o Ágar para teste de DNase com verde de metila.

- Prova da catalase: Baseia-se na capacidade da enzima catalase de decompor o peróxido de hidrogênio, liberando oxigênio, o que é evidenciado por meio da formação de borbulhas.

Limitações do Método

A metodologia para contagem de *S. aureus*, no que se refere aos resultados da prova de coagulase, apresenta limitações quanto à especificidade, devido ao fato de que algumas espécies de *Staphylococcus* relacionadas a animais, como o *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. delphini* e *S. schleiferi* ssp *coagulans*, também serem coagulase positivas. Cepas de *S. schleiferi* ssp *schleiferi* e algumas cepas de *S. lugdunensis* apresentam fraca reação na prova da coagulase. Além disso, o *S. schleiferi* ssp *schleiferi* apresenta reação de termonuclease positiva.

Reagentes

- Ágar Baird-Parker - base;
- Ágar Azul de Toluidina - DNA ou Ágar para ensaio de DNase, com verde de metila;
- Ágar estoque;
- Caldo Cérebro-Coração (BHD);
- Solução salina peptonada 0,1%;
- Solução salina 0,85%;
- Emulsão de gema de ovo a 50%;
- Telurito de potássio 3,5%;
- Plasma de coelho oxalatado ou com EDTA;
- Peróxido de hidrogênio 3%;
- Etanol 70% ou Etanol 70° GL.

Pesagem e preparo da amostra

- Pesar $25 \pm 0,2$ g da amostra e adicionar 225 mL de solução salina peptonada 0,1%;
- Homogeneizar por aproximadamente 60 segundos em “stomacher”. Essa é a diluição 10^{-1} .
- A partir da diluição inicial 10^{-1} , efetuar as diluições desejadas, inocular, sobre a superfície seca do Ágar Baird-Parker, 0,1 mL de cada diluição selecionada;
- Com o auxílio de alça de Drigalski ou bastão do tipo “hockey”, espalhar o inóculo cuidadosamente por toda a superfície do meio, até sua completa absorção;
- Utilizar no mínimo duas diluições decimais ou duplicata da mesma diluição;

- Nos casos em que a legislação exigir valores menores que 100 UFC/g ou mL, distribuir em duplicata 1 mL da diluição 10^{-1} em 3 placas (0,4 mL, 0,3 mL e 0,3 mL). No caso de produtos líquidos poderá ser inoculado 0,1 mL diretamente da amostra (10^0), o que corresponderá à diluição 10^{-1} .

Incubação

- Incubar as placas invertidas a 36 ± 1 °C por 30 a 48 horas;
- Selecionar as placas que contenham entre 20 e 200 colônias;
- Contar as colônias típicas (T): negras brilhantes com anel opaco, rodeadas por um halo claro, transparente e destacado sobre a opacidade do meio;
- Contar também colônias atípicas (A): acinzentadas ou negras brilhantes, sem halo ou com apenas um dos halos;
- Registrar separadamente as contagens de colônias típicas e atípicas;

- Selecionar 3 a 5 colônias de cada tipo (T) e/ou (A) e semear cada colônia em tubos contendo BHI, para confirmação;
- Incubar a 36 ± 1 °C, por 24 horas.

Observação: para a obtenção do número final de UFC/mL ou g, utilizar, de preferência, apenas uma diluição, pois, uma colônia atípica pode tornar-se típica na diluição subsequente em função da maior disponibilidade de nutrientes e pela menor competição bacteriana.

Prova da coagulase

- Transferir 0,3 mL de cada tubo de cultivo em BHI para tubos estéreis contendo 0,3 mL de plasma de coelho;
- Incubar a 36 ± 1 °C por 6 horas.
- Verificar a presença de coágulos, considerando os critérios a seguir:

Reação negativa: não formação de coágulo;

Reação 1+: coágulo pequeno e desorganizado;

Reação 2+: coágulo pequeno e organizado;

Reação 3+: coágulo grande e organizado;

Reação 4+: coagulação de todo o conteúdo do tubo, que não se desprenderá quando o tubo for invertido;

Quando a reação de coagulação for do tipo 3+ e 4+, considerar a prova positiva para *S. aureus*;

Quando a reação de coagulação for negativa, considerar a prova negativa para *S. aureus*.

Quando a reação for duvidosa do tipo 1+ e 2+, repicar do mesmo caldo de cultura para um tubo contendo ágar estoque ou outro contendo caldo BHI.

- Incubar a 36 ± 1 °C por 24 horas, para a realização dos testes complementares.

Testes complementares

A partir da cultura pura em BHI ou ágar estoque, realizar as seguintes provas confirmativas:

Coloração de Gram: Preparar esfregaço e corar pelo método de Gram.

A ausência de cocos Gram positivos indica teste negativo para *S. aureus*.

A presença de cocos Gram positivos indica a necessidade da realização de testes complementares.

Pesquisa de termonuclease:

- Fazer orifícios equidistantes com cerca de 2 mm de diâmetro no ágar para ensaio de termonuclease ou no Ágar Azul de Toluidina - DNA, em placas previamente preparadas;

- Colocar os tubos das culturas, mantidos em caldo BHI, em banho-maria fervente por 15 minutos;

- Deixar esfriar e preencher completamente um orifício para cada cultivo a ser analisado;

- Incubar a 36 ± 1 °C por 4 horas ou a 50 ± 2 °C por 2 horas.

O aparecimento, ao redor dos orifícios, de um halo rosa no Ágar Azul de Toluidina ou de um halo de clarificação no Ágar para ensaio de DNase com verde de metila, será indicativo de reação positiva para termonuclease. Considerar como positivas as culturas que apresentarem halo de diâmetro superior a 1 mm.

Prova da catalase:

- Com auxílio de alça de platina, bastão de vidro, palito de madeira ou Pipeta de Pasteur, estéreis, retirar uma alíquota do cultivo em ágar estoque e transferir para uma lâmina ou placa de vidro contendo uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%;

- Misturar o inóculo ao peróxido e observar a reação. A não formação de borbulhas indica prova negativa para catalase. A formação de borbulhas indica prova positiva para catalase. O *S. aureus* é catalase positiva.

Quando o número de colônias confirmadas for igual ao número de colônias selecionadas e repicadas, o resultado será igual à contagem inicial, levando-se em consideração a diluição utilizada.

Quando o número de colônias confirmadas for diferente do número de colônias selecionadas e repicadas, calcular a proporção de colônias positivas.

O resultado final será a soma dos resultados de colônias típicas e atípicas confirmadas. Expressar o resultado como: Contagem de *Staphylococcus aureus*: X x 10^y UFC/ g ou mL ou Contagem de *Staphylococcus coagulase* positiva: X x 10^y UFC/ g ou mL.

Pesquisa de *Salmonella*

Pré-enriquecimento

Baseia-se na incubação, a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 16 a 20 horas, de $25 \pm 0,2$ g ou $25 \pm 0,2$ mL da amostra, adicionada de 225 mL do diluente específico para cada caso. Esse procedimento visa minimizar os efeitos do processamento industrial dos alimentos, capaz de promover estresse nas células de *Salmonella*, sem inativá-las biologicamente.

Quando é utilizada solução salina peptonada tamponada, esta favorece a manutenção do pH, evitando que as bactérias acompanhantes acidifiquem o meio, prejudicando a recuperação das células de *Salmonella*.

Enriquecimento seletivo

Baseia-se na utilização de meios que contêm substâncias de ação impiedente do crescimento para a maioria dos micro-organismos interferentes e na incubação em temperatura seletiva. O enriquecimento seletivo de *Salmonella* se faz obrigatoriamente nos meios líquidos seletivos Caldo Rappaport Vassiliadis e Caldo Selenito-Cistina. Adicionalmente, utiliza-se o Caldo Tetracionato.

No caldo Rappaport Vassiliadis, a presença de verde malaquita e de cloreto de magnésio, associada à temperatura de $41 \pm 0,5$ °C por 24 a 30 horas atua como agentes seletivos da microbiota acompanhante, enquanto a presença de peptona de farinha de soja estimula o crescimento de *Salmonella*. No Caldo Selenito-Cistina, o agente inibidor selenito de sódio atua inibindo os Coliformes e Enterococos. Esse meio é incubado a $41 \pm 0,5$ °C por 24 a 30

horas. No Caldo Tetracionato, a seletividade é conferida pelo tetracionato e pelo verde brilhante.

Isolamento e seleção

Baseia-se na seleção de colônias de *Salmonella* em, pelo menos, dois meios sólidos: o Ágar Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose (BPLS) obrigatoriamente e outro Ágar de maior impediência escolhido pelo laboratório (XLD, HECTOEN, SALMONELLA SHIGELLA).

No Ágar Verde Brilhante, a novobiocina adicionada visa principalmente a inibição de *Proteus* sp. Esse meio apresenta em sua composição bile bovina e um corante derivado do trifenilmetano (verde brilhante), responsáveis pela inibição de micro-organismos Gram positivos.

Como meio de maior impediência, utilizar MLCB ou Rambach ou XLD ou XLT4 ou outro. No Ágar Rambach, a diferenciação entre *Salmonella* e outros micro-organismos é promovida pela presença de propilenoglicol, e também de um cromógeno que evidencia a hidrólise da betagalactosidase. No Ágar MLCB, a concentração de íons Magnésio promove o crescimento de *Salmonella*. A presença de verde-brilhante inibe a flora acompanhante. Esse ágar não utiliza a fermentação da lactose como sistema de identificação, o que possibilita a detecção de cepas de comportamento atípico no BPLS. A produção de H₂S é evidenciada pelo enegrecimento do centro da colônia.

Cepas de *Salmonella* H₂S negativas, como *Salmonella* Sendai, *Salmonella* Berta, *Salmonella* Pullorum e *Salmonella* Seftenberg, podem produzir colônias azuis. É um meio que, associado ao caldo de enriquecimento Rappaport Vassiliadis, tem sua seletividade substancialmente aumentada. A *Salmonella* Typhi e a *Salmonella* Paratyphi não crescem nesse meio devido à presença de verde-brilhante.

Pesagem e preparo da amostra

- Pesar $25 \pm 0,2$ g ou pipetar $25 \pm 0,2$ mL da amostra;
- Adicionar 225 mL de solução salina peptonada 1% tamponada (ver exceções na observação abaixo);
- Homogeneizar por aproximadamente 60 segundos no “stomacher”;
- Deixar 1 hora em temperatura ambiente.

Observação:

- Para leite em pó e soro de leite em pó, utilizar como diluente água destilada e adicionar 5 mL de verde brilhante solução aquosa 0,1%.
- Para produtos gordurosos (creme e manteiga) utilizar como diluente solução salina peptonada 1% tamponada com 1% de Tween 80.
- Para os demais alimentos, utilizar solução salina peptonada 1% tamponada.

Pré-enriquecimento

- O pré-enriquecimento se realiza por meio da incubação das alíquotas das amostras preparadas, a 36 ± 1 °C por, no mínimo, 16 horas e não mais que 20 horas.

Enriquecimento seletivo

- A partir do procedimento de pré-enriquecimento, inocular, simultaneamente, nos meios líquidos seletivos conforme abaixo:

- ✓ Inoculação em caldo Rappaport Vassiliadis:

Pipetar alíquotas de 0,1 mL das amostras pré-enriquecidas para tubos contendo 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis Incubar os tubos a $41 \pm 0,5$ °C, em banho-maria, preferencialmente com agitação ou circulação contínua de água, por 24 a 30 horas.

- ✓ Inoculação em Caldo Selenito Cistina:

Pipetar alíquotas de 1 mL das amostras pré-enriquecidas e transferir para tubos contendo 10 mL de Caldo Selenito Cistina;

Incubar os tubos a $41 \pm 0,5$ °C em banho-maria, preferencialmente com agitação ou circulação contínua de água, por 24 a 30 horas.

- ✓ Inoculação em Caldo Tetrionato (adicional):

Pipetar alíquotas de 1 mL das amostras pré-enriquecidas e transferir para tubos contendo 10 mL de Caldo Tetrionato;

Incubar os tubos a $41 \pm 0,5$ °C em banho-maria, preferencialmente com agitação ou circulação contínua de água, por 24 a 30 horas.

Isolamento

A partir dos caldos seletivos de enriquecimento, repicar sobre a superfície previamente seca de placas com cada meio sólido seletivo, estriando de forma a se obter colônias isoladas.

Dessa forma serão obtidas 2 placas de BPLS, uma originária do caldo Rappaport Vassiliadis e outra originária do Caldo Selenito Cistina e 2 placas do segundo meio seletivo utilizado pelo laboratório, obtidas do mesmo modo.

- Incubar todas as placas, invertidas, a 36 ± 1 °C por 18 a 24 horas.

Plaqueamento diferencial

Agitar os tubos de enriquecimento seletivo em agitador tipo “vortex” e estriar (estrias de esgotamento) uma alçada do caldo TT em placas de ágar Entérico de Hectoen (HE), ágar Bismuto Sulfito (BS) e ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD). Incubar as placas invertidas a 35 ± 2 °C/ 24 ± 2 h e verificar se há desenvolvimento de colônias típicas de *Salmonella* nos meios de plaqueamento.

Confirmação preliminar das colônias típicas de *Salmonella*

Selecionar pelo menos duas colônias típicas de cada placa, para confirmação preliminar. Na ausência de colônias típicas, selecionar as atípicas. Com o auxílio de uma agulha de inoculação, tocar levemente a massa de células, no centro da colônia e inocular em um tubo inclinado de ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI), por estrias na rampa e picada no fundo. Com o mesmo inoculo, sem flambar a agulha, inocular a cultura em um tubo de Ágar Lisina Ferro (LIA), por estrias na rampa e duas picadas no fundo. Guardar as placas sob refrigeração (5 a 8°C) e encubar os tubos a 35 ± 2 °C/ 24 ± 2 h.

Após o período de incubação, observar se há ocorrência de reação típica de *Salmonella*. Em TSI rampa alcalina (vermelha) e fundo ácido (amarelo), com ou sem produção de H₂S (escurecimento do ágar). Em LIA fundo e rampa alcalinos (roxo, sem alteração da cor do meio), com ou sem produção de H₂S (escurecimento do meio).

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods** 3º ed. New York: Vanderzant, 1992.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução-RDC n 12, de 02 de Janeiro de 2001. Aprova Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 2001. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/>. Acesso em: fev. 2015.

FRANCO, B. G. M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo, ed. Atheneu, 1999

JAMES, M. J. **Microbiologia moderna de los alimentos**. Zaragoza(Espana): Acribia, 4º ed. 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa Nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializar os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Disponível em: <http://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=75773>. Acesso em: fev. 2015.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A. ;SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**, São Paulo, Varela, 1997.

ANEXOS

Materiais disponíveis no laboratório de microbiologia do CTDR

Equipamentos
Balança Modelo BL 3200H Shimadzu
Microscopio Modelo XSP 303D/MBB 200 Instrutherm
Agitador Vortex Modelo EEQ9033B/ 220
Agitador com aquecimento Solab
Banho mariaSolab
Barriquete
Mesa agitadora - modelo SL 180/A
Autoclaves Primatec
pHmetro
BOD

Vidraria
Pipeta graduada (1 mL)
Pipeta graduada (10 mL)
Tela de amianto
Tubos de ensaio sem tampa (15 x 150 mm)
Tubos de ensaio sem tampa (15 x 100 mm)
Termômetros
Tubos de ensaio com tampa rosquedas
Tubos de Dühran
Provetas de vidro (100 mL)
Provetas de vidro (1000 mL)
Provetas de vidro (500 mL)
Provetas de plástico (500 mL)
Provetas de plástico (250 mL)
Provetas de vidro (10 mL)
Placas de Petri (10 x 40)
Tubos de ensaio de vidro com tampa rosqueada (13 x 100 mm)
Tubos de ensaio de vidro com tampa rosqueada (16 x 150 mm)
Balões de vidro (50 mL)
Béqueres vidro (600 mL)
Béqueres vidro (1000 mL)
Béqueres vidro (2000 mL)

Meios de Cultura
Ágar Lisina Ferro (LIA)
Ágar XLD
Ágar Bismuto sulfito (validade vencida)
Ágar Sugar Iron (TSI)
Caldo RP Vassilis
Caldo Lactose
Caldo Tetrionato
Caldo BHI
Peptona
Ágar Eosina Azul metileno
Ágar bacteriológica
Ágar base sangue
Ágar casoy
Ágar TSC
Ágar Glicosado
Caldo Tioglicolato
Caldo Rappaport (RP)
Caldo Lactose
Caldo EC
Solução Tampão 7 (validade vencida)
Solução Tampão 4 (validade vencida)
Caldo bile verde brilhante
Caldo Lauril Triptose

Outros
Estantes para tubos de plástico
Pissetas
Espátulas
Alças de platinas
Swabs
Tampas para tubos de ensaio
Pinça grande
Pipetadores Pump
Suportes para placa Petri (grande)
Suportes para placa Petri (pequeno)
Seringas descartáveis
Pêras
Pipetas Pasteur
Recipientes plásticos com tampa
Placas de Petri
Potes de plásticos
Suportes
Cesto de lixo
Escorredor de plástico
Lixeira para pia de plástico
Rôdo de pia