



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO CIÊNCIAS ANIMAIS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MARIA CAROLINA CABRAL DE VASCONCELLOS VINHAS

**PRÁTICAS DE MICROBIOLOGIA: RELATO DE *Candida albicans* EM CALOPSITA
(*Nymphicus hollandicus*)**

MOSSORÓ

2019

MARIA CAROLINA CABRAL DE VASCONCELLOS VINHAS

**PRÁTICAS DE MICROBIOLOGIA: RELATO DE *Candida albicans* EM CALOPSITA
(*Nymphicus hollandicus*)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal Rural
do Semi-árido como requisito para
obtenção do título de Bacharel em
MEDICINA VETERINÁRIA.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Marlon Carneiro Feijó

MOSSORÓ

2019

©Todos os direitos estão reservados à Universidade Federal Rural do Semi-árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996, e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata, exceto as pesquisas que estejam vinculadas ao processo de patenteamento. Esta investigação será base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) seja devidamente citado e mencionado os seus créditos bibliográficos.

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas
da Universidade Federal Rural do Semi-árido, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

V766p Vinhas, Maria Carolina Cabral de Vasconcellos.
Práticas de microbiologia: relato de Candida
albicans em calopsita (Nymphicus hollandicus) /
Maria Carolina Cabral de Vasconcellos Vinhas. -
2019.
78 f. : il.

Orientador: Francisco Marlon Carneiro Feijó.
Relatório (graduação) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Curso de Medicina
Veterinária, 2019.

1. Levedura. 2. Diagnóstico microbiológico. 3.
Psitacideo. I. Feijó, Francisco Marlon Carneiro,
orient. II. Título.

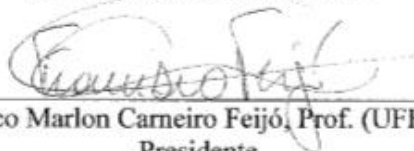
MARIA CAROLINA CABRAL DE VASCONCELLOS VINHAS

**PRÁTICAS DE MICROBIOLOGIA: RELATO DE *Candida albicans* EM CALOPSITA
(*Nymphicus hollandicus*)**

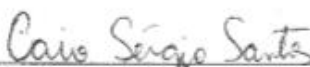
Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal Rural
do Semi-árido como requisito para
obtenção do título de Bacharel em
MEDICINA VETERINÁRIA.

Defendida em: 13 / 08 / 2019.

BANCA EXAMINADORA



Francisco Marlon Carneiro Feijó, Prof. (UFERSA)
Presidente



Caio Sérgio Santos
Mestre, M.V., Ufersa



Arickson Wesley da Silva Pereira
Médico Veterinário, Ufersa



Fabiano Rocha Prazeres Júnior
Médico Veterinário, Ufersa

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe Luciana C. V. Vinhas, as minhas irmãs Beatriz C.V. Vinhas e Letícia C.V. Vinhas, a minha avó Terezinha S. Vasconcellos e ao meu pai Fabiano Vinhas por terem me apoiado quando decidi cursar medicina veterinária e por sempre me darem o suporte necessário quando eu precisava. Por não terem me deixado desistir quando a saudade apertava e eu só queria voltar para casa. Por terem a paciência de esperar, às vezes por um ano, eu conseguir voltar para casa e passar um tempo com eles durante as férias. Sem vocês eu não teria conseguido e sempre serei grata por isso. Um agradecimento especial vai para meu tio Ricardo C. Vasconcellos, pois sem você nada disso seria possível.

Agradeço aos colegas de laboratório e aos amigos do hospital veterinário, em especial a Residente Diane Dias e ao meu amigo Emanuel Calixto, por sempre estarem presentes, e pelos momentos de descontração tão necessários durante a graduação, que é um desafio para qualquer pessoa.

Agradeço às minhas amigas Ruana R.L. Torquato, Maria de Lara O.L. e Íris S. Marques por estarem presentes desde o início dessa jornada, por todas as vezes que combinamos de estudar juntas, ou de sair para nos distrairmos um pouco, por todas as conversas e desabafos, e por vocês terem tornado essa jornada mais tranquila. Também gostaria de agradecer aos novos amigos, Fran e Sandy, pelos quais tenho muito carinho.

Agradeço ao meu amigo Caio S. Santos, técnico do laboratório de microbiologia veterinária, pela paciência de me ensinar todos os processos que precisávamos fazer no laboratório e por confiar em mim na hora de realizar os exames, por sempre me auxiliar quando tinha dúvidas, pelas conversas e momentos de descontração, e por sempre estar presente. Agradeço em especial ao meu orientador Francisco M. C. Feijó, por todo o aprendizado, pela paciência de me orientar nesse momento tão difícil, que é o último período do curso, e por ter me mostrado como é maravilhosa essa área de diagnósticos microbiológicos.

Agradeço aos médicos veterinários Arickson W.S. Pereira e Fabiano R.P. Júnior por aceitarem fazer parte da minha banca.

E agradeço ao amor da minha vida, minha gata Mia, por estar sempre comigo, por me fazer companhia nos momentos mais difíceis, quando não tinha ninguém com quem contar, por me fazer rir das suas loucuras, por me aguentar te apertando o tempo todo, e por me dar forças para continuar.

“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos.”

Charlie Chaplin.

RESUMO

No Brasil é cada vez mais comum a criação de animais silvestres e exóticos como animais de companhia, destacando-se os pequenos mamíferos (coelhos, porquinhos-da-índia), aves (periquitos, calopsitas), répteis (iguanas, jabutis) e peixes ornamentais (peixe-betta, neon cardinal). Os animais criados em cativeiro são susceptíveis a diversas enfermidades, entre elas as que são causadas por micro-organismos, que podem ter origem tanto primária como secundária. Com isso, maior é a demanda por atendimento com médico veterinário especializado e por métodos diagnósticos eficazes na identificação das diversas patologias que podem acometer esses animais. O presente estudo teve como objetivos descrever as atividades realizadas no laboratório de microbiologia veterinária da UFRSA, no período de 03 de Junho a 31 de Julho, destacando-se a análise das amostras provenientes da clínica de animais silvestres; apresentar a casuística dos casos recebidos; e relatar um caso de *Candida albicans* em psitacídeo da espécie *Nymphicus hollandicus*. Conclui-se que o diagnóstico microbiológico é um importante auxiliar para os médicos veterinários, pois ainda há poucos dados relatados acerca dos principais agentes etiológicos que acometem animais silvestres e exóticos, sobre a forma como eles agem no organismo do animal, e sobre a sensibilidade ou resistência desses agentes aos antimicrobianos.

Palavras-chave: levedura, diagnóstico microbiológico, psitacídeo.

ABSTRACT

In Brazil it is increasingly common to raise wild and exotic animals as companion animals, especially small mammals (rabbits, guinea pigs), birds (parakeets, cockatiels), reptiles (iguanas, jabutis) and fish ornamental (betta fish, neon cardinal). Animals being bred in captivity are susceptible to various diseases, including those caused by microorganisms, which may have both primary and secondary origin. Thus, the greater the demand for care with specialized veterinarians and for effective diagnostic methods in identifying the various pathologies that can affect these animals. This study aimed to describe the activities carried out at the UFERSA Veterinary Microbiology Laboratory, from June 3 to July 31, highlighting the analysis of samples from the institution's wildlife clinic; present the case series of the received cases; and report a case of psittacine candidiasis of the species *Nymphicus hollandicus*. It is concluded that the microbiological diagnosis is an important aid for veterinarians, as there are still few data reported about the main etiological agents that affect wild and exotic animals, how they act in the animal's organism, and on the sensitivity or resistance of these agents to antimicrobials.

Keywords: yeast, microbiological diagnosis, Psittacine

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Sala de identificação de bactérias	53
Figura 2	– Autoclave	53
Figura 3	– Sala de identificação fúngica	54
Figura 4	– Requisição do médico veterinário	56
Figura 5	– Processamento da amostra. (A) Exsudato caseoso contido em tubo “eppendorf”, (B) manipulação do exsudato caseoso, com auxílio de pinça, próximo a chama do bico de Bunsen, (C) fragmentação da amostra, com auxílio de bisturi estéril, em placa de Petri estéril (D) semeadura da amostra em meio de cultura ágar MacConkey.....	57
Figura 6	– Identificação bacteriana. (A) Citologia referente a <i>Streptococcus</i> , (B) cultura em ágar sangue em que se observa beta-hemólise, (C) prova de fenilalanina (positivo do lado direito e negativo do lado esquerdo) (D) prova de urease (positivo do lado esquerdo e negativo do lado direito) (E) prova de NaCl a 5% (positivo do lado esquerdo e negativo do lado direito)	58
Figura 7	– Identificação fúngica. (A) Citologia de levedura do tipo <i>Candida</i> sp., (B) cultura em ágar Chromagar em que se observa colônias de <i>Candida tropicalis</i> (C) cultura em ágar Chromagar em que se observa colônias de <i>Candida krusei</i> ..	59
Figura 8	– Realização de antibiograma. (A) Coleta de uma alíquota de cultura bacteriana, cultivada em caldo BHI, utilizando-se suabe estéril, (B) distribuição uniforme do inóculo em meio de cultura Mueller Hinton (C) colocação de discos de papel impregnados com antimicrobianos na superfície do meio de cultura	60
Figura 9	– Crosta em comissura de bico de ave da espécie <i>Nymphicus hollandicus</i> (círculo vermelho)	66
Figura 10	– (A) Colônias de <i>Candida albicans</i> em meio de cultura ágar Sabouraud-dextrose acrescido de cloranfenicol, (B) citologia de <i>Candida albicans</i> corada com azul de algodão láctico, (C) colônias de <i>Candida albicans</i> , de coloração verde-claro, em ágar Chromagar	67
Figura 11	– Cultivo de <i>Candida albicans</i> em meio de cultura EMB. (A) Jarra de anaerobiose, (B) incubação de <i>Candida albicans</i> em ambiente anaeróbico, (C) crescimento de <i>Candida albicans</i> em meio EMB	68

Figura 12	Prova de assimilação e fermentação de carboidratos (L – lactose; G – glicose; S – sacarose; M – maltose) ..	68
-----------	---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Relação das espécies animais cujas amostras foram enviadas para análise no Laboratório de Microbiologia Veterinária (LAMIV) dentro do período estudado.....	61
Tabela 2	–	Tipo de amostra recebida no LAMIV, dentro do período estudado.....	62
Tabela 3	–	Quantitativo das amostras positivas e negativas para crescimento bacteriano, em relação à classe animal	62
Tabela 4	–	Gêneros bacterianos identificados a partir de amostras recebidas no LAMIV, dentro do período estudado.....	63
Tabela 5	–	Resultados do número absoluto e porcentagem dos testes de susceptibilidade <i>in vitro</i> de 12 amostras positivas para crescimento bacteriano, frente a 15 antimicrobianos.....	63
Tabela 6	–	Quantitativo das amostras positivas e negativas para crescimento fúngico, em relação à classe animal.	64
Tabela 7	–	Espécies fúngicas identificadas das amostras recebidas no LAMIV, dentro do período estudado.	64

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	História da Microbiologia	16
2.2	Procariotos e Eucariotos	19
2.2.1	Bactérias	20
2.2.2	Fungos	20
2.3	Laboratório de microbiologia veterinária	21
2.4	Esterilização	22
2.4.1	Esterilização por calor seco	23
2.4.2	Esterilização por calor úmido	23
2.4.3	Esterilização química	24
2.4.4	Esterilização por radiação	24
2.4.5	Esterilização por filtração	25
2.5	Conservação dos micro-organismos	25
2.6	Diagnóstico microbiológico	26
2.6.1	Isolamento de micro-organismo em cultura pura	26
2.6.2	Citologia	27
2.6.2.1	Preparação do esfregaço	28
2.6.2.2	Coloração de Gram	29
2.6.2.3	Coloração simples	30
2.6.2.4	Coloração diferencial ácido resistente (método de Ziehl-Neelsen)	30
2.6.2.5	Colorações especiais	30
2.6.2.5.1	Coloração de flagelos (Método de Leifson)	30
2.6.2.5.2	Coloração de endósporos (Técnica de Schaeffer-Fulton)	31
2.6.2.5.3	Coloração para cápsulas (Método de Welch)	31
2.6.3	Cultura	31
2.6.3.1	Ágar e caldo BHI	33
2.6.3.2	Ágar sangue	34
2.6.3.3	Ágar MacConkey com cristal violeta	34
2.6.3.4	Ágar Sabouraud-Dextrose acrescido de cloranfenicol	34
2.6.3.5	Ágar Mueller Hinton	35

2.6.3.6	Chromagar	35
2.6.4	Testes bioquímicos.....	35
2.6.4.1	Prova de Citrato	36
2.6.4.2	Bile-esculina	36
2.6.4.3	Ágar DNase	37
2.6.4.4	Ágar fenilalanina	37
2.6.4.5	SIM	38
2.6.4.6	NaCl 6,5%	38
2.6.4.7	Redução de nitrato	38
2.6.4.8	Prova de oxidação e fermentação (O/F)	39
2.6.4.9	Ágar Tríplice açúcar (TSI)	39
2.6.4.10	Teste da uréase	40
2.6.4.11	Vermelho de metila (VM)	40
2.6.4.12	Voges-Proskauer (VP)	40
2.6.4.13	Prova de catalase	41
2.6.4.14	Prova de oxidase	41
2.7	Antibiograma	41
2.8	CIM (concentração inibitória mínima)	43
2.9	Animais silvestres e exóticos	44
2.9.1	Psittaciformes	46
2.9.2	Passeriformes	47
2.9.3	Osphronemidae	48
2.9.4	Leporidae	49
3	OBJETIVOS	51
4	INFRA-ESTRUTURA DO LABORATÓRIO E DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES	52
4.1	Descrição das atividades	54
4.1.1	Preparo dos meios de cultura	54
4.1.2	Recepção do material	55
4.1.3	Processamento das amostras recebidas	56
4.1.4	Identificação de bactérias	57
4.1.5	Identificação de fungos	58
4.1.6	Antibiograma	59

4.1.7	Descarte de material biológico	60
5	CASUÍSTICA	61
6	RELATO DO CASO	66
7	DISCUSSÃO	70
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
	REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o quarto maior país em população total de animais de estimação, tendo aproximadamente 54,2 milhões de cães, 39,8 milhões de aves, 23,9 milhões de gatos, 19,1 milhões de peixes, e mais 2,3 milhões de répteis e pequenos mamíferos, segundo estimativa do Instituto Pet Brasil (IPB) para o ano de 2018 (GERALDES, 2019). Observa-se, assim, um crescente interesse da população em possuir como animais de companhia não somente cães e gatos, mas também animais silvestres ou exóticos, representados por pequenos mamíferos (coelhos, porquinhos-da-índia), aves (periquitos, calopsitas), répteis (iguanas, jabutis) e peixes ornamentais (peixe-betta, neon cardinal) (WERTHER, 2004).

Em relação aos pets silvestres e exóticos, os que acumularam maior crescimento nos lares brasileiros, em comparação aos dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), do ano de 2013, foram os peixes com 6,1% de alta, seguido por répteis e pequenos mamíferos, que registraram alta de 5,7%, e aves com 5% de alta (GERALDES, 2019). Esses dados demonstram que a quantidade de animais silvestres e exóticos criados em cativeiro aumenta a cada ano, tornando-se frequente a busca por médicos veterinários especializados. Entre as principais enfermidades que podem acometer esses animais destacam-se as de origem infecciosa, incentivando o acesso às diversas formas de diagnóstico, entre eles o microbiológico, para identificação dos agentes etiológicos causadores da doença.

O diagnóstico microbiológico é feito em laboratórios especializados na identificação dos micro-organismos de importância na medicina veterinária. As formas mais comuns de identificação ocorrem por meio de citologia, cultivo e provas bioquímicas. Também é rotineira a realização de antibiograma para analisar o grau de sensibilidade ou resistência do micro-organismo aos diversos antimicrobianos, e com isso, auxiliar no melhor tratamento do caso investigado.

Os médicos veterinários que optam como o exercício profissional o diagnóstico laboratorial têm o estágio supervisionado obrigatório como uma importante ferramenta de ensino, pois contribui para a formação profissional do aluno, o qual adquire experiência na área escolhida. Em relação à microbiologia veterinária, essa é uma área de grande importância, na qual abrange a análise de amostras de diversas espécies animais, inclusive as que ocorrem menos frequentemente, sendo possível contribuir para maior obtenção de dados acerca da espécie analisada e, assim, auxiliar os médicos veterinários especializados na clínica de animais silvestres e exóticos.

A produção científica no Brasil, nos últimos anos, tem tido muitos avanços, destacando-se as publicações relacionadas à Medicina Veterinária. Ao se analisar essas publicações, refletiu-se o interesse do Médico Veterinário pela área de animais selvagens (CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2013).

Em um estudo de revisão que analisou o perfil das publicações brasileiras que abordaram medicina de animais selvagens de janeiro de 2010 a dezembro de 2012, foram identificadas sete áreas temáticas, com alguns agrupamentos conforme afinidade. Essas publicações abordaram Anatomia/Fisiologia (162/451), Parasitologia (97/451), Patologia (91/451), Saúde Pública/Epidemiologia (52/451), Microbiologia (25/451), Cirurgia/Anestesiologia (18/451) e Biologia/Ecologia (6/451) (CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2013). Com isso, pode-se observar que a área de microbiologia, que correspondeu a apenas 5,6 % dos assuntos abordados, ainda pode ser amplamente estudada.

Com isso, objetivou-se descrever as atividades realizadas no laboratório de microbiologia veterinária da Universidade Federal Rural do Semi-árido, no período de 03 de Junho a 31 de Julho de 2019, com foco nas amostras recebidas da clínica de animais silvestres e exóticos; apresentar a casuística; e relatar um caso de *Candida albicans* em calopsita (*Nymphicus hollandicus*).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 História da Microbiologia

A ciência da microbiologia evoluiu de uma série de significantes descobertas. O Inglês Robert Hooke, em 1665, marcou o início da teoria celular – todos os seres vivos são compostos de células – e em 1667, descreveu sua descoberta de fungos filamentosos, em seu livro intitulado *Micrographia*. Já o comerciante holandês e microscopista amador Anton van Leeuwenhoek foi o primeiro a observar os micro-organismos (ou “pequenos animalículos” como ele se referia), presentes em águas de rios, infusões de pimenta, saliva, fezes, usando um microscópio simples de lente única. Esta observação foi publicada em 1684 pelo Royal Society, em Londres (CISTIA, 2015; MADIGAN et al, 2016; PELCZAR JR; CHAN; KRIEG, 1997; TORTORA; FUNK; CASE, 2017).

A origem desses micro-organismos descobertos por Leeuwenhoek incitou diversas discussões surgindo assim duas teorias, a teoria da abiogênese ou geração espontânea e a teoria da biogênese. De acordo com a primeira, acreditava-se que os micro-organismos surgiam espontaneamente a partir de plantas ou animais em putrefação, enquanto que a segunda defendia que os micro-organismos originavam-se de células vivas preexistentes (PELCZAR JR; CHAN; KRIEG, 1997; TORTORA; FUNK; CASE, 2017).

A controvérsia continuou por anos até que, em 1864, Louis Pasteur construiu um frasco de colo longo e curvado, semelhante ao pescoço de cisne, que foi preenchido com caldo nutritivo e aquecido até a ebulição, sendo então esterilizado. O ar passava livremente através dos frascos abertos, porém as curvas no gargalo impediam a entrada de micro-organismos na solução nutritiva. O crescimento microbiano ocorreu somente após a abertura completa do recipiente. Este experimento finalizou a controvérsia da geração espontânea para sempre. Além desse feito, Pasteur também foi responsável por estudar os processos fermentativos e por dar origem ao processo de pasteurização (CISTIA, 2015; PELCZAR JR; CHAN; KRIEG, 1997).

Outra pessoa importante foi o médico alemão Robert Koch, o primeiro a descobrir o agente do carbúnculo e que, em 1882, conseguiu corar o bacilo da tuberculose com azul de metileno. Com a etiologia da Tuberculose, Koch conseguiu, pela primeira vez na história, identificar um micro-organismo patogênico (CISTIA, 2015). Além disso, formulou os postulados de Koch, para associar definitivamente causa e efeito em uma doença infecciosa. O primeiro postulado de Koch salientava a importância da cultura laboratorial do provável agente infeccioso, seguida pela introdução desse agente suspeito em animais saudáveis, e então, a

recuperação do patógeno dos animais doentes ou mortos (MADIGAN et al, 2016; PELCZAR JR; CHAN; KRIEG, 1997).

Em 1798, um médico inglês chamado Edward Jenner coletou raspados das feridas de vacas com varíola bovina e inoculou em um garoto. Posteriormente injetou amostras que continham o agente da varíola humana, a qual ocasionava quadros mais sérios que a varíola bovina, e o garoto não adquiriu a varíola humana. Anos mais tarde, Pasteur aplicou este princípio de imunização em galinhas, para prevenção da cólera aviária. Ele descobriu que a bactéria causadora da cólera aviária perdia sua capacidade de causar a doença após cultivo em laboratório por longos períodos. Com isso, Pasteur utilizou o termo vacina para cultura de micro-organismos avirulentos utilizados para inoculação preventiva (PELCZAR JR; CHAN; KRIEG, 1997; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

O segundo postulado de Koch afirmava que um patógeno suspeito devia ser isolado e crescido longe de outros microrganismos em uma cultura laboratorial. Assim, R. Koch e seu colega Walther Hesse observaram que, quando um meio cultura sólido era incubado em ambiente aeróbio, massas de células bacterianas, chamadas de colônias, se desenvolviam, cada uma exibindo cores e formas características. Koch deduziu que cada colônia correspondia a uma população de células idênticas, as quais formavam uma cultura pura (MADIGAN et al, 2016; PELCZAR JR; CHAN; KRIEG, 1997).

Esses meios de cultura utilizados geralmente eram compostos por gelatina. Porém, em 1881, W. Hesse obteve sucesso ao utilizar o ágar, um polissacarídeo de algas, como um agente para os meios de cultura, pois agar é resistente à digestão microbiana e à liquefação. Assim, este polissacarídeo passou a ser utilizado pelos cientistas em substituição da gelatina (MADIGAN et al, 2016; PELCZAR JR; CHAN; KRIEG, 1997).

Quanto ao cientista alemão-polonês Ferdinand Cohn (1828-1898), interessado na resistência térmica apresentada por bactérias, descobriu que algumas bactérias formavam endósporos, como os *Bacillus*. Descobriu também que as células vegetativas de *Bacillus*, mas não seus endósporos, eram mortas pela água em ebulição, além de desenvolver métodos altamente eficazes para prevenir a contaminação de meios de cultura, como a utilização de algodão para fechar os frascos e tubos (MADIGAN et al, 2016).

Em 1839, a micose foi a primeira doença humana causada por fungos a ser encontrada, e em seguida houve o reconhecimento de *Candida albicans* como a causa do sapinho. Mas foi somente em 1910 foi que Sabouraud introduziu um meio que apoiaria o crescimento de fungos patogênicos (BD DIAGNOSTICS, 2009).

No ano de 1860, um cirurgião inglês chamado Joseph Lister pesquisava maneiras de manter as incisões cirúrgicas livres de contaminação pelos micro-organismos. Ele descobriu que o fenol destruía as bactérias e passou a usá-lo nas cirurgias. Seus experimentos deram origem às técnicas assépticas atuais que previnem infecções (PELCZAR JR; CHAN; KRIEG, 1997).

Em relação ao patologista dinamarquês Hans Christian Gram, no ano de 1884, este desenvolveu, de maneira empírica, o método de coloração que passou a ter seu nome e que permitiu dividir as bactérias em dois grandes grupos: Gram-positivos e Gram-negativos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Posteriormente, no ano de 1887, um associado de Koch chamado Richard J. Petri inventou a chamada placa de Petri, que revolucionou microbiologia. Com a invenção da placa de Petri, o foco voltou-se para formulações de meios de cultura (BD DIAGNOSTICS, 2009; PELCZAR JR; CHAN; KRIEG, 1997; MADIGAN et al, 2016).

No que se refere a atividade antibiótica, esta foi relatada pela primeira vez em 1929, quando um médico e bacteriologista escocês, Alexander Fleming, observou a formação de um halo inibitório ao redor de colônias de fungo do gênero *Penicillium* sp., onde o crescimento bacteriano havia sido inibido. O princípio ativo do fungo foi chamado de penicilina. Porém, o sucesso da purificação da penicilina só ocorreu em 1940 por Florey e Chain, o que permitiu o prosseguimento dos testes clínicos do antibiótico e, em seguida, a produção em larga escala do antimicrobiano (QUINN et al, 2007; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

A expansão do estudo de microbiologia começou após a Segunda Guerra Mundial, com o crescimento da biologia molecular, biotecnologia e estudo da genética. O nascimento da biologia molecular teve início em 1953 após a publicação por Watson e Crick da estrutura do DNA. Nesse mesmo ano, os vírus foram definidos por Luria como “submicroscópicas entidades, capazes de serem introduzidos em condições de vida celulares e de se reproduzem dentro de tais células apenas”. O cultivo dos vírus em embriões de galinhas levaram ao desenvolvimento das vacinas (BD DIAGNOSTICS, 2009).

Como uma ciência biológica aplicada, a microbiologia está na linha de frente de vários avanços importantes na medicina humana e medicina veterinária. Desde causadores de doenças infecciosas, até aqueles usados em combustível de automóveis, os micro-organismos afetam a vida cotidiana dos seres humanos e animais tanto de forma benéfica quanto de forma prejudicial (MADIGAN et al, 2016).

2.2 Procariotos e eucariotos

A partir da descoberta e do início dos estudos dos micro-organismos, ficou claro que a divisão dos seres vivos em dois reinos, animal e vegetal, era insuficiente. Assim, o zoologista alemão E.H. Haeckel, em 1866, sugeriu a criação de um terceiro reino, denominado Protista, o qual englobava bactérias, algas, fungos e protozoários (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; PELCZAR JR; CHAN; KRIEG, 1997).

Porém, com os avanços da microscopia eletrônica da década de 1940, pode-se observar muito mais a estrutura celular interna do que era possível com os microscópios ópticos. Assim, uma descoberta importante quanto a taxonomia foi de que as células microbianas, anteriormente denominadas Protistas, poderiam ser divididas em duas categorias, com base na forma como a substância nuclear se apresenta no interior da célula, em procariótica e eucariótica (PELCZAR JR; CHAN; KRIEG, 1997). Na primeira, o equivalente nuclear, representado por um único cromossomo, não é circundado pela membrana nuclear, enquanto que na segunda o núcleo é limitado pela membrana nuclear que separa o núcleo do citoplasma da célula (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Já no ano 1977, Carl Woese e colaboradores, baseando-se no sequenciamento comparativo de moléculas de RNAr e evidência genômica e bioquímica associada, propuseram que a classificação dos seres vivos fosse substituída por um esquema baseado em três Domínios: Bacteria, Archaea e Eucarya, sendo os dois primeiros exclusivamente microbianos e compostos por células procarióticas, e o terceiro Domínio, Eucarya, aquele que engloba todos os organismos eucariotos, sendo este domínio subdividido em quatro reinos: Animalia, Plantae, Fungi e Protista, segundo a classificação proposta por Whittaker, em 1969 (BROOKS et al., 2014; MADIGAN et al., 2016; MONTEIRO, 2017).

Os procariotas, que incluem os domínios Bacteria e Archaea, consistem em células pequenas, em geral da ordem de 0,5 a 5 μm de diâmetro, e estruturalmente bastante simples, com ausência de membrana nuclear e de organelas, e com ribossomos dispersos no citoplasma. O DNA de quase todas as bactérias é circular, representando por um único cromossomo procarioto, sendo a região especializada da célula que contém DNA denominada nucleóide. Quanto a divisão celular, esta geralmente ocorre por fissão binária (BROOKS et al., 2014; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017; VERMELHO et al., 2014; MADIGAN et al., 2016).

Os eucariotas, que pertencem ao domínio Eukarya, são caracteristicamente maiores que os procariotas e contêm em suas células uma variedade de estruturas citoplasmáticas envoltas em membranas chamadas de organelas, como mitocôndrias e cloroplastos. Os agentes responsáveis pela motilidade das células eucarióticas são os flagelos ou cílios, estruturas

complexas que não se assemelham aos flagelos dos procariotos. Quanto as paredes celulares, quando estão presentes, são quimicamente simples e a divisão célula geralmente ocorre por mitose (MADIGAN et al., 2016; BROOKS et al., 2014; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

2.2.1 Bactérias

As bactérias, do domínio Bacteria, podem ser divididas em três grupos principais: Gram-positivas, Gram-negativas e Micoplasmas. Esses micro-organismos são classificadas em três grupos básicos, de acordo com a forma em cocos, bacilos e espiroqueta. A orientação e o grau de ligação das bactérias durante a divisão celular determinam os arranjos. Quanto a estrutura, as bactérias podem apresentar uma parede celular composta por um polissacarídeo complexo, o peptidoglicano, que permite diferenciar as bactérias em Gram-negativas e Gram-positivas (LEVINSON, 2010).

As bactérias do tipo Gram-negativas compõem um grupo heterogêneo que possui um complexo envelope celular (do tipo gram-negativo) constituído de membrana externa, espaço periplasmático contendo uma camada interna delgada de peptidoglicano (que contém ácido murâmico) e membrana citoplasmática. Já o envelope dos organismos gram-positivos consiste em uma espessa e uniforme parede celular composta por peptidoglicano e ácidos teicóicos, que determina a forma celular, e também possui uma membrana citoplasmática (BROOKS et al., 2014; QUINN et al., 2007).

Quanto aos micoplasmas, estes são microrganismos que carecem de parede celular e não sintetizam os precursores do peptidoglicano, sendo delimitados por uma membrana plasmática. Os micoplasmas são microrganismos altamente pleomórficos cujo tamanho varia de formas vesiculares a formas filtráveis muito pequenas (0,2 μm) (BROOKS et al., 2014).

Em relação as arqueobactérias, pertencentes ao domínio Archaea, estas têm como característica apresentar parede celular com ausência de peptidoglicano. Além disso, esses micro-organismos apresentam muitas características similares às das células eucarióticas e podem ser encontrados em ambientes extremos (elevado teor de sal, altas temperaturas, anaeróbios) (BROOKS et al., 2014; QUINN et al., 2007; TORTORA; FUNK; CASE, 2017).

2.2.2 Fungos

Fungos são organismos eucariotos, não fotossintéticos. Alguns podem ser microscópicos em tamanho, enquanto outros são muito maiores, como os cogumelos. Possuem parede celular rígida, composta principalmente de quitina, e podem ser uni ou multicelulares. Como todos os eucariontes, as células fúngicas possuem pelo menos um núcleo circundado pela

membrana nuclear e diversas organelas (BROOKS et al., 2014; PELCZAR JR; CHAN; KRIEG, 1997; TORTORA; FUNK; CASE, 2017).

Os fungos podem ser divididos em dois grupos, de acordo com a morfologia de seu talo, em filamentosos ou bolores (multicelulares) e leveduras (unicelulares). Os fungos filamentosos têm uma variação muito grande. Eles podem iniciar o seu desenvolvimento a partir de um conídeo, que é uma estrutura de reprodução assexuada. Quando submetido à condições favoráveis, o conídeo germina dando origem a uma estrutura tubular que é denominada hifa, de 2 a 10 µm de diâmetro. Esta cresce linearmente, invadindo o substrato sobre o qual se encontra. Ao se ramificarem, as hifas formam um emaranhado que é denominado micélio, que cresce até tornar-se visível a olho nu (bolor) (CRUZ, 2010; BROOKS et al., 2014).

Já as leveduras são unicelulares, geralmente de forma esférica a ovoide, de elipsoide a filamentosa, de 3 a 15 µm de diâmetro, que não formam micélio e não possuem meio de locomoção. Como as colônias e a morfologia microscópica de inúmeras leveduras são muito semelhantes, as espécies são identificadas com base em testes bioquímicos e algumas diferenças morfológicas essenciais (BROOKS et al., 2014; PELCZAR JR; CHAN; KRIEG, 1997). As leveduras se dividem por brotamento, formando os blastoconídeos, que podem desprender-se da célula-mãe ou permanecer, em algumas espécies, ligados à ela, produzindo brotos que não se separam uns dos outros formando uma pequena cadeia de células, denominada pseudo-hifa (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

As principais subdivisões (phyla) dos fungos são: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota e os "deuteromicetos" (ou fungos imperfeitos).

O filo Ascomycota (ou ascomicetos) abrange mais de 60% dos fungos conhecidos e cerca de 85% dos patógenos de humanos e animais. Os demais fungos patogênicos são membros do filo Basidiomycota (basidiomicetos) ou do filo Glomerulomycota. O filo Ascomycota (ascomicetos) é composto por leveduras, como *Saccharomyces* e *Candida*, e por bolores como os *Coccidioides*, *Blastomyces* e *Tricophyton*. Quanto ao filo Basidiomycota (basidiomicetos), este possui como exemplos os cogumelos e o *Cryptococcus*. Já o filo Glomerulomycota tem como representantes os *Rhizopus*, *Lichtheimia*, *Mucor* e *Cunninghamella*. (BROOKS et al., 2014).

2.3. Laboratório de Microbiologia Veterinária

Todos os profissionais que trabalham em laboratório de microbiologia estão diretamente em contato com os mais diversos materiais clínicos e também com os micro-organismos

isolados de culturas, portanto há potencialmente um grande risco de infecção (OPLUSTIL et al., 2010).

Para minimizar o risco nos laboratórios de microbiologia de se trabalhar com micro-organismos infecciosos e com amostras suspeitas de contê-los, o Departamento dos Estados Unidos Saúde e Serviços Humanos publicou diretrizes para manuseio desses agentes e materiais (BD DIAGNOSTICS, 2009).

As diretrizes descrevem quatro níveis de biossegurança em que os laboratórios de microbiologia podem ser divididos, descritos a seguir:

- As práticas do laboratório de nível de Biossegurança 1 são aplicáveis quando o trabalho é feito com estirpes definidas e caracterizadas de organismos viáveis que não causam doenças ao homem e com baixo risco para os colaboradores do laboratório e para o meio ambiente. O trabalho é feito em bancadas abertas seguindo as boas práticas de laboratório;
- As práticas do laboratório de nível de Biossegurança 2 são aplicáveis aos laboratórios em que o trabalho é feito com o amplo espectro de agentes indígenas de risco moderado para os colaboradores do laboratório e para o meio ambiente;
- As práticas do laboratório de nível de Biossegurança 3 são aplicáveis aos laboratórios que trabalham com agentes que apresentam risco infeccioso elevado e que podem causar infecções graves e potencialmente letais. Todas as manipulações laboratoriais devem ser realizada em um gabinete de segurança biológica ou outro equipamento fechado para proteger o pessoal e o ambiente da exposição a aerossóis potencialmente infecciosos;
- As práticas do laboratório de nível de biossegurança 4 são aplicáveis ao trabalho com agentes altamente perigosos que podem ser transmitidos via a rota do aerossol, para a qual não existe vacina disponível ou terapia e para o qual equipamento especializado e instalações são necessárias.

(BD DIAGNOSTICS, 2009; OPLUSTIL et al., 2010)

2.4 Esterilização

A esterilização é uma prática comum nos laboratórios de microbiologia, e se refere a qualquer processo ou procedimento projetado para eliminar completamente toda e qualquer célula viva em crescimento ativo de um material ou meio, seja na forma vegetativa ou em latência, incluindo os endósporos bacterianos. A esterilização não deve ser confundida com desinfecção, sanitização, pasteurização ou antissepsia, as quais apenas se destinam a inativar, inibir ou remover os microorganismos em sua forma vegetativa. A esterilização pode ser

realizada pelo uso de calor, produtos químicos, radiação ou filtração (BD DIAGNOSTICS, 2009; CASAL, 2004).

O calor é o método de eleição usado para o controle do crescimento e para eliminar os micro-organismos por ser seguro, econômico e não formar produtos tóxicos (VERMELHO et al., 2014). Existe a esterilização por calor úmido e por calor seco. A ação do calor úmido (vapor saturado) promove a desnaturação e coagulação de proteínas estruturais e enzimas, levando a perda da integridade celular e morte, já o calor seco promove a morte dos micro-organismos por oxidação (ABDI; ABIHPEC; SEBRAE, 2015; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; PELCZAR JR; CHAN; KRIEG, 1997; VERMELHO et al., 2014).

2.4.1 Esterilização por calor úmido

A esterilização por calor úmido pode ser conseguida somente por meio de autoclavagem. Porém, há duas técnicas capazes de reduzir o número de micro-organismos viáveis em uma amostra, a fervura e a pasteurização (MADIGAN et al, 2016).

A fervura (100°C) inativa todas as formas vegetativas dos patógenos, muitos vírus, fungos e seus esporos em até 15 minutos, mas é necessária uma temperatura mais alta para matar endosporos bacterianos resistentes e alguns vírus em um período razoável de tempo. Assim, esse método é mais empregado para tornar alimentos e água seguros para serem ingeridos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; CASAL, 2004; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

Já a pasteurização utiliza um aquecimento precisamente controlado para reduzir o número total de micro-organismos presentes no leite e em outros líquidos que seriam destruídos se autoclavados. Nas temperaturas e tempos utilizados para a pasteurização de alimentos, atualmente 72°C em 15 segundos, todas as bactérias patogênicas são mortas (MADIGAN et al., 2016; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

Para realizar a esterilização de materiais e meios de cultura, o aparelho mais utilizado é a autoclave, que é um dispositivo de aquecimento selado que emprega vapor d'água sob pressão e alcança temperaturas acima da fervura da água (120°C). Geralmente, as autoclaves de laboratório funcionam sob a pressão de vapor de 1 atm a temperatura de 121°C, o que ajuda na penetração de calor para o material a ser esterilizado, e, de uma forma geral, os materiais ficam esterilizados em 15-40 minutos (CASAL, 2004; BD DIAGNOSTICS, 2009; MADIGAN et al., 2016; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

2.4.2 Esterilização por calor seco

O calor seco é efetivo apenas em níveis consideravelmente maiores de temperaturas e tempos mais longos do que o calor úmido. A forma mais simples de esterilização por calor seco é a flambagem. Os microbiologistas empregam este procedimento rotineiramente em laboratório ao esterilizar as alças de platina (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

O calor seco pode ser usado para materiais como instrumentos de metal, que seriam corroídos pelo calor úmido, e também para pós, pomadas, óleos e materiais densos que não seriam facilmente penetrados pelo vapor. A esterilização pode ser feita em forno à temperatura de 160 ° C por 120 minutos (VERMELHO et al., 2014; PELCZAR JR; CHAN; KRIEG, 1997).

A incineração também é uma forma de esterilização que emprega calor seco, sendo usada para queimar sacos e copos de papel, plástico, carcaça de animais, materiais descartáveis, etc (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; PELCZAR JR; CHAN; KRIEG, 1997).

2.4.3 Esterilização Química

As substâncias químicas que têm efeitos deletérios sobre os organismos agem, normalmente, causando hidrólise de proteínas, enzimas ou de ácidos nucleicos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Os agentes químicos empregados no controle dos micro-organismos podem ser esterilizantes ou desinfetantes. Os esterilizantes matam todos os micro-organismos em um ambiente ou material e os desinfetantes reduzem a carga microbiana. O termo desinfetante é usado para designar o agente químico capaz de provocar a desinfecção de superfícies inanimadas. Já o termo antisséptico é utilizado para caracterizar tipos de desinfetantes usados em tecidos vivos, em um processo denominado antisepsia (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

Na esterilização química pode-se empregar esterilizantes gasosos e líquidos para determinados instrumentos médicos e industriais. Os gases incluem óxido de etileno, formaldeído e beta-propiolactona. Já os esterilizantes líquidos incluem glutaraldeído, peróxido de hidrogênio, ácido peracético, dióxido de cloro e formaldeído. A esterilização química não deve ser empregada na preparação de meio de cultura devido a efeitos desfavoráveis sobre o desempenho (BD DIAGNOSTICS, 2009; PELCZAR JR; CHAN; KRIEG, 1997).

2.4.4 Esterilização por Radiação

A esterilização por radiação é um tratamento opcional para materiais sensíveis ao calor. Isso inclui radiação não-ionizante e radiação ionizante.

A luz ultravioleta, um tipo de radiação não-ionizante, é quimicamente ativa e causa excitação de átomos dentro da célula microbiana, particularmente os ácidos nucleicos, produzindo mutações letais. Esta ação faz com que o micro-organismo pare de reproduzir. Como a luz ultravioleta carece de poder penetrante, suas aplicações limitam-se apenas a tratamentos de superfície e de ar, sendo amplamente utilizada para descontaminar e desinfetar fluxos laminares equipados com uma lâmpada UV, e também para desinfetar o ar circulante em hospitais e salas de preparação de alimentos (MADIGAN et al., 2016; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

A radiação ionizante, ao contrário dos raios ultravioletas, penetra profundamente em átomos e causa ionização dos elétrons, formando radicais super-reativos (superóxidos) e estes reagem com componentes celulares orgânicos, dentre eles o DNA, matando ou inativando os micro-organismos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). A radiação gama é usada com mais frequência que os raios X ou elétrons de alta energia para fins de esterilização, sendo empregada para tratar de produtos sensíveis ao calor, incluindo materiais e equipamentos médicos, farmacêuticos, biológicos e equipamentos de laboratório (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

2.4.5 Esterilização por Filtração

Em 1884, Charles Chamberland, que desenvolveu a autoclave, descreveu o uso de filtros para remover bactérias de água potável (PELCZAR JR; CHAN; KRIEG, 1997). A filtração é um método útil para esterilizar líquidos e gases. Por este método exclui-se micro-organismos ao invés de destruí-los. Para isso, um líquido ou gás passa através de um filtro, um dispositivo contendo poros de dimensões muito pequenas que impedem a passagem de quaisquer células que possam estar presentes. Dois tipos principais de filtros podem ser usados, filtros de membrana e filtros de profundidade. O primeiro retira as partículas, enquanto que a profundidade do segundo as aprisiona (BD DIAGNOSTICS, 2009; MADIGAN et al., 2016).

2.5 Conservação dos micro-organismos

O alvo de qualquer método de conservação é preservar a viabilidade e principalmente proporcionar estabilidade genética do microrganismo ao isolamento, pelo maior tempo possível, evitando assim a formação excessiva de mutações que alterem suas características (SOLA et al., 2012). Para se conservar os micro-organismos é necessário metabolismo seja reduzido tanto quanto possível, pois, nessas condições, o micro-organismo permanece viável por um tempo mais prolongado (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Uma das técnicas mais simples consiste em inocular o microrganismo em meio adequado, incubar em ambiente favorável à multiplicação e depois estocar em baixas temperaturas. Nesta situação, é aconselhável o armazenamento de culturas sob refrigeração (5 a 8°C). Os microrganismos podem permanecer viáveis por muito tempo, sendo em média de um a três meses para leveduras, e em torno de cinco a doze meses para bactérias (SOLA et al., 2012).

Outra técnica consiste em recobrir a cultura com uma camada de óleo mineral estéril, reduzindo assim o suprimento de oxigênio e, conseqüentemente, o metabolismo microbiano. Um dos problemas de se utilizar esse método de conservação é que, com o decorrer do tempo, muitos micro-organismos podem sofrer mutações e, com isso, terem suas características alteradas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; SOLA et al., 2012).

Além dessas, há o congelamento comum, que se baseia na conservação de agentes em temperaturas relativamente baixas entre -4 e -20°C. Esse é um dos métodos de manutenção mais simples e baratos, além de oferecer boa segurança para o armazenamento de diversos microrganismos por períodos de três meses a dois anos, devido a uma redução significativa no metabolismo celular. Como desvantagem, verifica-se possível redução da viabilidade de alguns microrganismos, em função dos danos causados às células em decorrência da formação de cristais de gelo e da variação eletrolítica na faixa de temperatura utilizada (TORTORA, FUNKE, CASE, 2017; DELLARETTI, 2014).

Também pode-se recorrer a técnica de dessecação por liofilização, que é considerada uma das técnicas mais eficientes para a manutenção de microrganismos, por garantir a viabilidade dos agentes por 17 a 20 anos. A técnica se baseia na remoção da água intracelular de materiais biológicos congelados, por sublimação, evitando a formação de cristais de gelo capazes de provocar danos às estruturas celulares, além de poder degradar enzimas presentes no citosol, levando a morte dos agentes (DELLARETTI, 2014).

Outra técnica utilizada é a conservação ultrabaixas temperaturas, utilizando-se de nitrogênio líquido (-179 °C). Empregando as duas técnicas – liofilização e nitrogênio líquido –, os micro-organismos podem ser guardados por muito tempo, até mesmo durante anos, sem que haja necessidade de renovação e sem alterações em suas propriedades (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

2.6. Diagnóstico Microbiológico

2.6.1 Isolamento de micro-organismos em cultura pura

As amostras típicas recebidas em um laboratório de diagnóstico clínico incluem sangue, urina, fezes, escarro, pelos, líquido cefalorraquidiano ou secreção de ferimentos. Para coleta desses materiais, swabs estéreis são frequentemente utilizados. Em alguns casos, pequenos fragmentos de tecido (biópsia) podem ser obtidos para a cultura ou exame microscópico (MADIGAN et al, 2016).

A transferência de um micro-organismo para um meio de cultura pode ser chamada de repique, semeadura, ou inoculação. Dependendo do caso, podem-se utilizar alças ou agulhas de inoculação, alça de Drigalsky, pipetas comuns, pipetas Pasteur, micropipetas automáticas e swabs (VERMELHO et al., 2014). A amostra pode ser inoculada na superfície de um meio sólido ou em tubo contendo meio de cultura líquido (MADIGAN et al, 2016).

Existem diversas técnicas de inoculação, entre elas a técnica de esgotamento por estrias é a mais utilizada. Nesse processo faz-se o esgotamento do material contido numa alça ou agulha de semeadura na superfície do meio, por meio de estrias, de modo que, ao final, a alça poderá depositar células isoladas no ágar. Outra técnica consiste na semeadura em superfície, na qual o inóculo em suspensão é espalhado na superfície do ágar com auxílio de uma alça de vidro. Uma outra abordagem é o método Pour-plate, no qual o inóculo em suspensão é misturado em ágar fundido que tenha sido resfriado a 45°C, e distribuído em placas de Petri estéreis (BROOKS et al., 2014; PELCZAR JR; CHAN; KRIEG, 1997).

Durante a incubação do meio inoculado, as células individuais multiplicam-se e produzem um grande número de células, que juntas formam uma colônia, que é uma cultura pura com um ancestral único, visível a olho nu (PELCZAR JR; CHAN; KRIEG, 1997).

2.6.2 Citologia

O microscópio óptico de campo luminoso é o mais empregado em microbiologia de rotina, e consiste em duas séries de lentes (objetiva e ocular), que funcionam em conjunto na resolução de imagens. Estes microscópios geralmente empregam uma objetiva com poder de aumento de 100 vezes, com uma ocular de aumento de 10 vezes, aumentando uma amostra 1.000 vezes, o que possibilita a visualização de diversos micro-organismos, como fungos e bactérias (BROOKS et al., 2014).

Em relação às bactérias de interesse médico, estas podem apresentar diferentes formas e arranjos. Quanto a forma podem ser esféricas (cocos), cilíndricas (bacilos) ou espiraladas. Os cocos são redondos, mas podem ser ovais, alongados ou achatados em uma das extremidades. Quando as bactérias em forma de cocos se dividem, as células podem permanecer unidas umas às outras, surgindo em decorrência cocos aos pares (diplococos), cadeia (estreptococos) e cachos

(estafilococos). Menos frequentes são aquelas que se dividem em dois ou três planos, permanecendo unidas em grupos de 8 indivíduos (sarcinas) (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; MADIGAN et al., 2016; PELCZAR JR; CHAN; KRIEG, 1997; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

Os bacilos podem se apresentar aos pares (diplobacilos) ou em cadeia (estreptobacilos). Alguns bacilos se assemelham a lanças, outros têm extremidades arredondadas ou então retas. Outros bacilos assemelham-se tanto aos cocos que, por isso, são chamados cocobacilos. Bactérias espiraladas podem ter um ou mais espirais. Quando têm o corpo rígido e são como vírgulas, são chamadas vibriões, e espirilos quando têm a forma de saca-rolhas. Há ainda um grupo de organismos espiralados, mas de corpo flexível, os espiroquetas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; PELCZAR JR; CHAN; KRIEG, 1997; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

A forma das bactérias é uma característica genética e geralmente as bactérias são monomórficas, isto é, mantêm uma única forma. Entretanto, algumas condições ambientais ou de cultivo faz com que alguns poucos micro-organismos apresentem-se como pleomórficos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

Uma vez que os microrganismos são transparentes, é frequente o uso de corantes para melhor visualização da forma e do tipo de arranjo. Os métodos de coloração mais empregados na bacteriologia médica são os de Gram e de Ziehl-Neelsen (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Em relação aos fungos, o exame microscópico direto é o método mais utilizado no diagnóstico de rotina. Além de ser rápido e sensível, permite a visualização do micro-organismo e, em muitas ocasiões, sua identificação (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Por possuírem morfologia bastante variada, os fungos filamentosos são mais fáceis de identificar por meio de citologia em comparação aos fungos leveduriformes, que são morfológicamente semelhantes. Entrando, alguns gêneros de leveduras como *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Geotrichum*, *Malassezia* e *Trichosporon*, podem apresentar características específicas (BRASIL, 2004).

2.6.2.1 Preparação do esfregaço

A limpeza das lâminas histológicas é imprescindível para confecção de um bom esfregaço. Elas normalmente são lavadas com água e sabão, enxaguadas em água e deixadas em um recipiente com etanol a 95%. Antes da utilização, as lâminas devem ser retiradas do recipiente com uma pinça e secas com papel-toalha (VERMELHO e al., 2014).

2.6.2.2 Coloração de Gram

Essa técnica foi desenvolvida em 1884 pelo bacteriologista dinamarquês Hans Christian Gram e é coloração diferencial mais utilizada em bacteriologia. Esta coloração separa as bactérias em dois grandes grupos: as Gram-positivas e as Gram negativas (VERMELHO et al., 2014; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). O método ou técnica de Gram, consiste no tratamento sucessivo de um esfregaço bacteriano, fixado pelo calor, com os seguintes reagentes: cristal violeta, lugol, álcool e fuccina (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Toda bactéria, quer seja Gram-positiva, quer seja Gram-negativa, absorve de maneira idêntica o cristal-violeta e o lugol, adquirindo a cor roxa devido ao complexo insolúvel formado pelas duas substâncias no citoplasma da célula. Entretanto, com a adição do solvente orgânico, que pode ser um álcool ou uma solução de álcool-cetona, a porção lipídica da membrana externa das bactérias Gram-negativas e o complexo cristal violeta-iodo é removido, descorando as células. Já no caso das bactérias Gram-positivas, que possuem uma parede celular mais espessa e diferente das bactérias Gram negativas, o complexo cristal violeta-iodo se liga a componentes presentes na parede celular e o corante primário é retido, assim, as células permanecem coradas (ABDI; ABIHPEC; SEBRAE, 2015; VERMELHO et al., 2014; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

Em seguida, a amostra é tratada com um corante secundário, a fucsina básica, que é aplicada para corar as bactérias Gram-negativas que se tornaram incolores após a lavagem com solução descorante. Quando se observa no microscópio as bactérias que adquirem a coloração púrpura são chamadas de Gram-positivas e aquelas que adquirem a coloração cor-de-rosa a vermelha são chamadas de Gram-negativas (ABDI; ABIHPEC; SEBRAE, 2015; VERMELHO et al., 2014; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

Os procedimentos para se corar as bactérias pelo método de Gram consistem em: corar o esfregaço com cristal violeta por 1 minuto, remover o corante com água destilada; colocar a solução de lugol sobre o esfregaço durante 1 minuto; remover a solução de lugol com água destilada; lavar o esfregaço com solução descorante até que a lâmina fique transparente; remover a solução com água destilada, adicionar fuccina durante 30 segundos e lavar com água destilada. Esperar a lâmina secar para olhar ao microscópio (VERMELHO et al, 2014).

As interpretações dos esfregaços corados pelo Gram envolvem considerações relacionadas com as características da coloração, tamanho, forma e agrupamento das células (BRASIL, 2000).

2.6.2.3 Coloração simples

A coloração das bactérias ou de outros micro-organismos com um único corante básico é denominada coloração simples. Após o esfregaço ser fixado, essa coloração é aplicada e deixada para agir por um determinado período. A lâmina é então lavada com água destilada e, após secar, pode ser examinada. Alguns exemplos de corantes simples são: azul de metileno, cristal violeta e safranina (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

2.6.2.4 Coloração diferencial ácido resistente (método de Ziehl-Neelsen)

A coloração ácido resistente se liga fortemente as bactérias que apresentam um material seroso em sua superfície, assim, essa técnica é utilizada para identificação de bactérias do gênero *Mycobacterium* e também para identificação de linhagens patogênicas do gênero *Nocardia*, sendo essas bactérias consideradas ácido resistentes (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

Para se proceder essa coloração, o corante vermelho carbolfucsina é aplicado à um esfregaço fixado, e a lâmina é aquecida levemente por alguns minutos, pois o calor facilita a penetração do corante pela parede da bactéria. Após a lâmina ser resfriada e lavada, o esfregaço é tratado com um solvente descorante álcool-ácido, que remove o corante vermelho das bactérias que não são ácido-resistentes. É utilizado, então, um contracorante, o azul de metileno, que cora de azul as bactérias não ácido resistentes. As bactérias ácido resistentes são coradas de vermelho pela carbolfucsina (BROOKS et al., 2014; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017; VERMELHO et al., 2014).

2.6.2.5 Colorações especiais

As colorações especiais são aquelas utilizadas para corar porções dos micro-organismos, como os endósporos, flagelos ou cápsulas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

2.6.2.5.1 Coloração de flagelos (Método de Leifson)

Os flagelos bacterianos são estruturas de locomoção muito pequenas e finas para serem visualizadas ao microscópio. Assim, pelo método de Leifson, utiliza-se um mordente, como o ácido tânico, para ser depositado de forma continuada sobre as células, provocando a formação de um precipitado maciço sobre as paredes celulares. Com isso, o diâmetro aparente dos flagelos aumenta. A adição subsequente de fuccina básica torna-os visíveis ao microscópio óptico (BROOKS et al., 2014; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017; VERMELHO et al., 2014).

2.6.2.5.2 Coloração de endósporos (Técnica de Schaeffer-Fulton)

Endósporo é uma estrutura especialmente resistente, dormente, formada dentro de uma célula que protege a bactéria de condições ambientais adversas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). Bactérias anaeróbicas do gênero *Clostridium* e *Desulfotomaculum* e aeróbicas do gênero *Bacillo* são exemplos de micro-organismos que desenvolvem essas formas de resistência denominadas endósporo. Estes endósporos não se coram facilmente, e os métodos de coloração normalmente utilizam o calor como forma de facilitar a penetração do corante (VERMELHO et al., 2014).

O método de coloração de endósporos mais comumente utilizado é o de Schaeffer-Fulton. Nesse método, a coloração primária verde-malaquita é aplicada a um esfregaço já fixado, o qual é aquecido em vapor por cerca de cinco minutos. Então a preparação é lavada até que seja removido o corante de todas as partes da célula, exceto dos endósporos. A adição do contracorante safranina cora apenas as células vegetativas de vermelho, e os endósporos aparecem em verde dentro dessas células (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017; VERMELHO et al., 2014).

2.6.2.5.3 Coloração para cápsulas (Método de Welch)

Muitos micro-organismos contêm uma cobertura gelatinosa, chamada de cápsula (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). Para corar as cápsulas das bactérias é necessário usar o corante cristal-violeta, seguido de um agente descolorante que também age como contracorante, o sulfato de cobre. Nesse método, o esfregaço deve apenas ser seco ao ar, pois a fixação pelo calor causa encolhimento da cápsula. Após secar, deve-se adicionar o corante cristal violeta na amostra, que cora tanto a célula quanto a cápsula. Em seguida, acrescenta-se o sulfato de cobre, que se liga à cápsula, gerando uma coloração diferencial. Ao microscópio, a cápsula aparece na cor azul clara, enquanto que o restante das células e o meio à sua volta apresentam uma coloração púrpura devido ao cristal violeta (BROOKS et al., 2014; VERMELHO et al., 2014).

2.6.3 Cultura

O meio de cultura consiste em um material nutritivo preparado para o crescimento de micro-organismos em laboratório. Tendo em vista a ampla diversidade metabólica dos micro-organismos, existem vários tipos de meios de cultura que satisfazem as variadas exigências nutricionais. Porém, além dos nutrientes, é preciso também fornecer condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento dos micro-organismos, tais como pH (geralmente entre 6,5 e 7,5), pressão osmótica, disponibilidade de água, temperatura (crescimento à 37°C para a

maioria das bactérias patogênicas), atmosfera (aeróbia, microaeróbia ou anaeróbia), dentre outros (ABDI; ABIHPEC; SEBRAE, 2015; QUINN et al, 2007).

Basicamente existem dois grandes grupos de meios de cultura: os meios quimicamente definidos e os meios complexos. Os meios quimicamente definidos são aqueles cuja composição química exata é conhecida. Para que as bactérias possam crescer nesse meio, elas devem ser incubadas em presença de luz e em condições de aerobiose. Também pode-se adicionar fontes orgânicas de energia como glicose ou aminoácido triptofano (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; MADIGAN et al., 2016; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

Se o objetivo for cultivar micro-organismos mais exigentes pode-se enriquecer o meio com substâncias altamente nutritivas, como o extrato de carne. Nesse momento, o meio passa a ser chamado complexo, pois contém um produto cuja composição química não é quimicamente definida. Esse tipo de meio emprega as mais variadas substâncias em sua composição como peptonas; extratos de órgão de animais como fígado, cérebro e coração; extratos de vegetais como soja, arroz; ou outras como sangue, soro, etc (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; MADIGAN et al., 2016).

Além destes, há o meio seletivo, que contém compostos que inibem seletivamente o crescimento de alguns micro-organismos, mas não de outros. Muitas vezes a seletividade do meio depende da adição de algum composto inibidor dos indesejáveis. Assim, por exemplo, o ágar de MacConkey (que contém corante básico) seleciona bactérias Gram-negativas, enquanto que a azida sódica inibe as bactérias Gram-negativas em detrimento das Gram positivas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; BROOKS et al., 2014).

Um tipo específico de meio seletivo é o meio de enriquecimento. Esse meio é preparado para favorecer a multiplicação de micro-organismos de interesse, quando estes estão presentes em pequeno número em relação à microbiota de acompanhamento (VERMELHO et al., 2014). O meio fornece nutrientes e reproduz o ambiente natural (“nicho”), o que favorece o crescimento de um micro-organismo específico e não de outros. Com frequência, essa metodologia é empregada em amostras de solo e fezes (BROOKS et al. 2014; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

Ao contrário, existem os meios não-seletivos, como o ágar-sangue e o ágar-chocolate, que sustentam o crescimento de diferentes bactérias. Esses meios são destinados ao isolamento de diferentes espécies, tantas quanto possível, produzindo inúmeras colônias bacterianas (BROOKS et al., 2014).

Já os meios diferenciais são aqueles que conferem características especiais às colônias que, em condições normais, seriam idênticas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Para isso

adiciona-se um indicador ao meio que revela, através de uma mudança de coloração, se uma reação metabólica em particular ocorreu durante o crescimento (p.ex., formação de colônia rosa a vermelha em Ágar MacConkey por bactérias que fermentam lactose) (MADIGAN et al., 2016). Também pode-se avaliar a expressão de enzimas extracelulares que pode ser detectada como zonas claras circundando as colônias (p.ex., zonas de hemólise em ágar sangue) (BROOKS et al., 2014).

Também existem os meios para o crescimento de anaeróbios, os chamados meios redutores. Esses meios contêm ingredientes, como o agente redutor tioglicolato de sódio, que se combina quimicamente com o oxigênio e torna-o indisponível para os micro-organismos. Os laboratórios podem utilizar sistemas de incubação dos micro-organismos em caixas e jarras seladas, nas quais um catalisador de paládio acelera a reação do hidrogênio com o oxigênio, formando água após as placas de cultura serem introduzidas e o recipiente ser selado (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017; VERMELHO et al., 2014).

Um meio de cultura quanto à consistência pode ser sólido (como ágar ou gelatina), semissólido (pouco ágar ou gelatina) ou líquido. Para que um meio torne-se sólido, o ágar, que é um polissacarídeo complexo derivado de alga marinha, é adicionado (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

Os meios de cultura mais utilizados no laboratório de microbiologia veterinária da UFERSA para identificação de micro-organismos de amostras clínicas são o ágar sangue Base®, ágar MacConkey®, ágar BHI® (Brain Heart Infusion), caldo BHI, ágar Sabouraud® e ágar Mueller Hinton®.

2.6.3.1 Ágar e caldo BHI

O ágar Brain Heart Infusion (BHI) deriva os seus nutrientes dos componentes da infusão de cérebro-coração, da peptona e da dextrose. Esse é um meio de utilização geral, adequado para a cultura de uma grande variedade de tipos de organismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos provenientes de amostras clínicas. Também 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 (BRASIL, 2013).

Já o caldo BHI é utilizado na recuperação de micro-organismos fastidiosos ou não, incluindo bactérias aeróbicas e anaeróbicas, e fungos. A turvação do meio indica crescimento de micro-organismos (BRITO, 2010).

2.6.3.2 Ágar sangue

Ágar sangue é um meio rico, não seletivo e diferencial para hemólise. Nesse meio crescem a maioria das bactérias Gram negativas e Gram positivas, fungos filamentosos (bolores) e leveduras, exceto algumas espécies de hemófilos e outros micro-organismos fastidiosos (BRASIL, 2013). Este meio propicia o desenvolvimento da maioria das bactérias patogênicas de importância médica (VERMELHO et al., 2014).

Para ser confeccionado necessita de um meio comercial que pode ser o Blood Ágar Base, Columbia Ágar Base, Ágar BHI ou Ágar Mueller Hinton. Essa base deve ser esterilizada em autoclave e, após atingir a temperatura de 45 a 50 graus, deve-se acrescentar 5 ml de sangue desfibrinado de carneiro ou coelho para cada 100 ml de meio (BRASIL, 2013; BD DIAGNOSTICS, 2009).

Na interpretação do resultado pode-se identificar a beta hemólise, em que há presença de um halo transparente ao redor das colônias semeadas (lise total dos eritrócitos), a alfa hemólise, em que há presença de halo esverdeado ao redor das colônias semeadas (lise parcial dos eritrócitos), ou gama hemólise (sem hemólise), em que há ausência de halo ao redor das colônias (eritrócitos permanecem íntegros) (BRASIL, 2013).

2.6.3.3. Ágar MacConkey com cristal violeta

O ágar MacConkey é um meio seletivo para bactérias Gram negativas e diferencial para a utilização de lactose, sendo utilizado principalmente para isolar bacilos Gram-negativos (enterobactérias e não fermentadores). Esse é um meio específico para bactérias Gram-negativas pois o cristal violeta inibe o crescimento de micro-organismos Gram-positivos, especialmente Enterococos e Estafilococos. Também é utilizado para verificar a fermentação ou não da lactose, já que as bactérias Gram-negativas, que produzem ácido láctico a partir deste açúcar, podem ser diferenciadas das bactérias Gram-negativas que não o produzem. As colônias que utilizam lactose, formando ácido láctico, tornam-se rosa a avermelhadas, uma vez que o indicador de pH vermelho neutro também faz parte do meio. Já as colônias não fermentadoras de lactose são incolores (BRASIL, 2013; BD DIAGNOSTICS, 2009; PELCZAR JR; CHAN; KRIEG, 1997).

2.6.3.4 Ágar Sabouraud-Dextrose acrescido de cloranfenicol

Esse é um meio de pH ácido (5,8) e que contém elevado teor de glicose, que favorecem o crescimento de diversos fungos leveduriformes e filamentosos (BRASIL, 2013). Nesse meio pode-se adicionar antimicrobianos, como cloranfenicol, que é inibitório a uma ampla gama de

bactérias gram-negativas e gram-positivas, e também, pode-se acrescentar cicloheximida, que é um agente antifúngico ativo principalmente contra fungos saprófitas. A vantagem desse antifúngico é que ele não inibe leveduras ou dermatófitos (BD DIAGNOSTICS, 2009).

2.6.3.5 Ágar Mueller Hinton

O ágar Mueller Hinton é um meio de cultura recomendado para a realização de antibiograma. Esse meio possui uma substancial fonte de proteínas e carboidratos que proporcionam o desenvolvimento e crescimento de cepas bacterianas de interesse clínico. Além disso, a baixa concentração de timina e timidina e níveis adequados de Cálcio e Magnésio, evitam falsos resultados de sensibilidade ou resistência microbiana (BRITO, 2014; BD DIAGNOSTICS, 2009).

2.6.3.6 Chromagar

O Chromagar é um meio de isolamento e identificação para *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* de amostras clínicas. Esse meio pode ser utilizado como meio de isolamento seletivo para outras espécies de leveduras e para fungos filamentosos, além de possuir uma ação inibidora para as bactérias (BD DIAGNOSTICS, 2009).

A utilidade de um meio seletivo e diferencial para o isolamento primário de espécies de *Candida* tem sido observado há muito tempo. Em 1953, Nickerson desenvolveu um meio seguindo um estudo de redução de sulfito pelas espécies de *Candida*. Em 1958, Pagano et al. teria adicionado cloreto de trifetil tetrazólio em meio Sabouraud Dextrose para diferenciar *C. albicans* de outras leveduras. Atualmente, com a inclusão de substratos cromogênicos no meio, as colônias de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* produzem cores diferentes, permitindo assim a detecção direta destas espécies de levedura na placa de isolamento (BD DIAGNOSTICS, 2009).

Colônias de *C. albicans* aparecem verde claro a verde médio, colônias de *C. tropicalis* aparecem as colônias de aparecem azuis esverdeadas a azul metalizado e *C. krusei* parecem rosa claro com uma borda esbranquiçada. Outras leveduras podem desenvolver sua cor natural (creme) ou aparecem de cor clara a escura (por exemplo, *C. glabrata*). Uma vantagem adicional deste meio consiste é a fácil detecção de culturas mistas de leveduras devido à apresentação das suas colônias com cores diferentes (BD DIAGNOSTICS, 2009).

2.6.4 Testes bioquímicos

Os resultados das provas bioquímicas são amplamente utilizadas em associação aos resultados obtidos por meio de citologia e cultivo para se fazer uma avaliação presuntiva de um patógeno bacteriano, visto que as propriedades metabólicas são únicas para cada espécie (QUINN et al, 2007, VERMELHO et al., 2014). A identificação definitiva da bactéria está geralmente baseada em testes bioquímicos e sorológicos. Testes adicionais podem ser usados para auxiliar na identificação de micro-organismos específicos (QUINN et al, 2007).

As provas bioquímicas estão fundamentadas principalmente na pesquisa de enzimas estruturais, importantes no metabolismo do micro-organismo (ex. fenilalanina, catalase), na pesquisa de produtos metabólicos e catabólicos (ex. indol, ácidos orgânicos), e na sensibilidade a diferentes compostos (ex. bacitracina, novobiocina) (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Teste bioquímicos específicos podem ser utilizados para identificar diferentes grupos de bactérias como Enterobactérias, cocos Gram-positivos, bacilos Gram-negativos não fermentadores, bactérias anaeróbicas estritas e leveduras (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

2.6.4.1 Prova de Citrato

Determina se um micro-organismo é capaz de utilizar o citrato como única fonte de carbono para o seu metabolismo e crescimento, com alcalinidade resultante. É utilizado para diferenciar gêneros e espécies de enterobactérias, de micro-organismos Gram-negativos relacionados e de bactérias não fermentadoras (MACFADDIN, 2004).

O meio mais comumente utilizado é o citrato de Simmon, no qual o citrato de sódio é a única fonte de carbono e o fosfato de Amônia, a única fonte de nitrogênio. As bactérias que produzem a enzima citratase conseguem utilizar o citrato como única fonte de carbono. Quando a bactéria utiliza o citrato, este é removido do meio e CO₂ é liberado. Esse CO₂ combina-se com o sódio do citrato de sódio e água para formar carbonato de sódio, que alcaliniza o meio.

O reagente utilizado como indicador de pH é o azul de bromotimol (VERMELHO et al., 2014). Se for positivo, o meio adquire uma intensa cor azul no bico de flauta ou crescimento no local do inóculo. Se for negativo não há crescimento e a cor permanece verde (BRASIL, 2013; MACFADDIN, 2004).

2.6.4.2 Bile-esculina

É uma prova que diferencia gêneros e espécies de enterobactérias e micro-organismos não fermentadores e que também é usada para identificação presuntiva de espécies de *Enterococcus* e *Streptococcus*. O teste verifica se a bactéria é capaz de hidrolisar a esculina na presença de bile. A hidrólise da esculina resulta na formação de glicose e de um composto

chamado esculetina. A esculetina reage com citrato férrico do meio, formando um complexo de coloração marrom escuro ou preto, indicando resultado positivo. Se for negativo a coloração permanece inalterada (palha) (BRASIL, 2013; TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

2.6.4.3 Ágar DNase

Determina a capacidade de um micro-organismo de produzir a enzima desoxirribonuclease (DNase) capaz de despolimerizar o ácido desoxirribonucleico (MACFADDIN, 2004).

É uma prova de identificação que separa os principais micro-organismos de importância clínica, entre eles tem-se os DNase positivos: *Staphylococcus aureus*, *Serratia* spp. e *Proteus* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Cryseobacterium meningosepticum*, *Moraxella catarrhalis*; e os DNase negativos: *Staphylococcus coagulase* negativa, demais enterobactérias, e os demais bacilos Gram negativos não fermentadores (BRASIL, 2013).

Com auxílio da alça de platina, deve-se tocar nas colônias em estudo e fazer um esfregaço circular e denso na placa de DNase, que deve ser incubada em estufa bacteriológica durante 24 horas. As cepas de alguns micro-organismos produzem as enzimas DNase e endonuclease termoestável as quais hidrolisam ácido desoxirribonucleico (DNA) contido no meio de cultura (BRASIL, 2013).

Após 24 horas, deve-se colocar ácido clorídrico (HCl) sobre o crescimento bacteriano até banhar totalmente a superfície do meio e aguardar aproximadamente 3 minutos ou até que o meio fique opaco. O resultado é positivo quando há presença nítida de halo claro na parte inferior e em volta da colônia, e é negativo quando há ausência de halo claro em volta da colônia (BRASIL, 2013).

2.6.4.4 Ágar fenilalanina

Essa prova determina a capacidade da bactéria de produzir ácido fenilpirúvico a partir da fenilalanina por via enzimática, com a produção de acidez (MACFADDIN, 2004). É utilizada para diferenciar gêneros e espécies de enterobactérias, principalmente *Proteus*, *Morganella* e *Providencia*. O teste consiste na detecção de ácido fenilpirúvico, após o crescimento do micro-organismo em meio contendo o aminoácido. O aparecimento de uma coloração verde escura após a adição do reagente cloreto férrico 10% sobre a superfície do meio indica resultado positivo. O resultado é negativo quando a cor do meio permanece inalterada (amarelo palha) (BRASIL, 2013; TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

2.6.4.5 SIM

A prova SIM determina a habilidade do micro-organismo de metabolizar o triptofano, por meio da enzima triptofanase, em indol, ácido pirúvico e amônia. O teste indol é baseado na formação de um complexo vermelho quando o indol reage com o reagente de Erlich ou Kovacs, após a adição de 5 gotas de um destes reagentes (VERMELHO; TRABULSI E ALTERTHUM, 2004). Se o teste for indol positivo será formado um anel vermelho na superfície do meio, e se for indol negativo, o anel será amarelo (BRASIL, 2013).

Por essa prova também realiza-se a leitura da motilidade e do H₂S. Se for motilidade positiva, os micro-organismos móveis migram pela linha do inóculo e difundem-se no meio causando turbidez, e se for motilidade negativa a bactéria tem um crescimento acentuado ao longo da linha do inóculo, em volta continua límpido (BRASIL, 2013).

A habilidade de certas bactérias de formar H₂S a partir de compostos que contenham enxofre é uma característica importante para sua identificação. O H₂S é produzido a partir da ação de uma tiosulfato-redutase sobre o tiosulfato de sódio, sendo evidenciado pela reação do H₂S com o citrato férrico amoniacal, originando sulfeto de ferro, um sal insolúvel de cor negra. Nesse caso o resultado é positivo. Se for H₂S negativo não haverá formação de cor negra em torno do inóculo (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

2.6.4.6 NaCl 6,5%

A tolerância ao NaCl a 6,5% é uma prova utilizada para verificar a capacidade de alguns micro-organismos crescerem em presença do sal. Essa prova diferencia *Enterococcus* spp. que são NaCl 6,5 % positivo, de *Streptococcus* spp., que são NaCl 6,5% negativos. Se o resultado for positivo ocorre crescimento bacteriano (turbvação do meio) com ou sem viragem do indicador. Se for negativo há ausência de crescimento e o meio permanece com a cor original púrpura e sem turbvação (BRASIL, 2013).

2.6.4.7 Redução de nitrato

É utilizado para detectar a habilidade do micro-organismo para reduzir nitrato a nitrito, por meio da enzima nitrogênio redutase. Se a redução ocorre, há também formação ácido nitroso, que então reage com o Reagente I (sulfato sufanílico), formando um composto que reage com o Reagente II (alfa-naftilamina), para formar outro composto que possui uma cor vermelho intensa, sendo o resultado positivo. A ausência de coloração no meio após a adição dos reagentes I e II indicam negatividade para o teste (VERMELHO et al., 2014).

2.6.4.8 Prova de oxidação e fermentação (O/F)

Essa prova auxilia na identificação das bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas (MACFADDIN, 2004). A conversão de carboidratos em produtos ácidos pode ocorrer tanto aerobicamente, pela oxidação, como anaerobicamente, pela fermentação. De forma geral, a maioria das bactérias de interesse médico são anaeróbicas facultativas (VERMELHO et al., 2014).

Nessa prova pode-se diferenciar bacilos Gram negativos e cocos Gram positivos quanto ao tipo de metabolismo empregado em utilizar carboidratos. Para isso, deve-se fazer a inoculação da bactéria em estudo em dois tubos, sendo que em um dos tubos acrescenta-se 1,0 ml de óleo mineral e no outro tubo não se coloca óleo mineral (BRASIL, 2013).

No tubo contendo óleo mineral observa-se se houve fermentação, que é processo metabólico de oxidação-redução que ocorre em anaerobiose, e, em vez de oxigênio, um substrato orgânico serve como aceptor final de hidrogênio. Na reação de fermentação de açúcares, há formação de ácidos orgânicos como metabólitos. A produção desses ácidos provoca uma diminuição do pH do meio. Assim, o teste consiste em detectar a acidificação do meio de cultura, utilizando um indicador de pH, o vermelho de fenol, que em pH ácido é amarelo (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

O micro-organismo é oxidador quando no tubo aberto a cor do meio fica amarela e no tubo fechado fica inalterada (verde). Quando é fermentador, tanto o tubo aberto quanto fechado desenvolve cor amarela. E é assacarolítico (inerte) quando tubo aberto e fechado não mudam a coloração (verde) (BRASIL, 2013).

2.6.4.9 Ágar Tríplice açúcar (TSI)

Esse é um meio empregado na triagem de enterobactérias (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004). Este meio contém três açúcares: glicose, lactose e sacarose; vermelho de fenol para detecção da fermentação de carboidratos; e sulfato de ferro para detecção da produção de sulfato de hidrogênio (indicado pela cor preta na base do tubo). A fermentação é indicada pela mudança da cor do indicador de pH de vermelho para amarelo (BRASIL, 2013).

O ágar fundido é deixado solidificar, formando uma superfície inclinada. Essa configuração origina duas câmaras de reação dentro do mesmo tubo. A porção inclinada ou bico, exposta em toda sua superfície ao oxigênio atmosférico, é aeróbia. A porção inferior, denominada profundidade ou fundo, está protegida do ar e é relativamente anaeróbia (BRASIL, 2013).

A cor original do meio é vermelho laranja, levemente opalescente. A leitura deve ocorrer entre 18 e 24hs. A cor púrpura indica alcalinidade, e a cor amarelo indica acidez. Reações: se o ápice for cor púrpura e a base amarela, é indicativo de fermentação apenas da glicose (lactose e sacarose negativos). Se for amarelo/amarelo, indica a fermentação da glicose + lactose e/ou sacarose (2 ou 3 açúcares). Pode haver presença de gás (CO²), identificada como bolhas ou meio fragmentado. É H²S positivo, se houver presença de precipitado negro (BRASIL, 2013).

2.6.4.10 Teste da urease

Determina a habilidade do micro-organismo de hidrolisar a ureia em duas moléculas de amônia pela ação da enzima urease, resultando na alcalinização do meio (MACFADDIN, 2004). Essa amônia produzida leva a um aumento do pH, o que causa uma mudança de cor no indicador de fenol, que passa a ser rosa. Isso indica resultado positivo para o teste. Se não houver mudança de cor o teste é negativo. O meios para utilizados para identificação de urease são: caldo Stuart e ágar de Chistensen (VERMELHO et al., 2014).

Quando o resultado fica positivo rapidamente, de 1 a 6 horas, é indicativo para *Proteus* spp. Se o resultado ficar positivo tardiamente, de 24 horas a 6 dias (ou mais), é indicativo de algumas cepas de *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Haemophilus* (BRASIL, 2013).

2.6.4.11 Vermelho de metila (VM)

O teste de vermelho de metila (VM) é utilizado para identificar espécies bacterianas que produzem ácidos orgânicos (lático, acético e fórmico) a partir da fermentação da glicose. Muitas espécies de enterobactérias utilizam essa via de fermentação da glicose. A formação dos ácidos pode ser detectada pela adição do indicador vermelho de metila, que se for positivo vai apresentar a superfície vermelha e se for negativo não tem mudança de coloração (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004; VERMELHO et al., 2014).

2.6.4.12 Voges-Proskauer (VP)

Uma outra via de fermentação de glicose que as bactérias podem utilizar é a via da acetoína. O ácido pirúvico é formado pela degradação fermentativa da glicose. Para o teste de VP deve-se adicionar ao tubo o reagente de Barritt “A” (que contém alfa-naftol) e após, aplicar o reagente “B” (que contém KOH). Se a acetoína é produzida a partir do ácido pirúvico oriundo do metabolismo da glicose, ele reagirá com o alfa-naftol e KOH produzindo uma coloração

vermelha ao meio. Se a acetoína não for produzida, a reação fornece uma coloração amarelada ou cor de cobre, indicando um teste negativo (VERMELHO et al., 2014).

2.6.4.13 Prova de catalase

Este teste é utilizado para identificar organismos que produzem a enzima catalase, que decompõe o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio. É utilizada para diferenciar espécies de *Staphylococcus* e *Micrococcus* da espécie *Streptococcus*, que é catalase negativa (MACFADDIN, 2004; TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

A maioria das bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas produz peróxido de hidrogênio a partir de flavoproteínas, gerando oxigênio livre ao final da reação. Se o peróxido de hidrogênio se acumula na célula, ele se torna tóxico porque o peróxido é uma molécula altamente reativa que promove danos aos componentes celulares. Por isso, muitas bactérias produzem a enzima catalase (VERMELHO et al., 2014).

Com auxílio da alça de platina, deve-se pegar uma amostra da colônia em estudo, colocar sobre uma lâmina de vidro, e sobre ela depositar uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%. O resultado é positivo quando se tem a presença imediata de bolhas, devido à formação de oxigênio (O_2) pela quebra do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e é negativo quando há ausência de bolhas ou efervescência (BRASIL, 2013; MACFADDIN, 2004; TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

2.6.4.14 Prova de oxidase

O teste de oxidase é baseado na produção intracelular da enzima oxidase pela bactéria. Essa prova ajuda a distinguir não fermentadores (oxidase positiva) de enterobactérias (oxidase negativa). Com auxílio de um palito de madeira ou plástico, deve-se espalhar a colônia a ser testada sobre a fita de oxidase. Se for oxidase positiva há produção de cor roxa imediatamente no local da inoculação da bactéria. Se for oxidase negativa não há mudança da cor do papel no local da inoculação da bactéria (BRASIL, 2013).

2.7 Antibiograma

Antibiogramas são testes que têm por objetivo verificar a sensibilidade de determinado micro-organismo a vários antibióticos mediante comparação usando um padrão preestabelecido (VERMELHO et al., 2014). Em muitas situações, sob o ponto de vista do clínico, os resultados do antibiograma são considerados mais importantes do que a própria identificação do micro-organismo envolvido no processo infecciosos (SBPC/ ML, 2015).

Os laboratórios de microbiologia clínica podem escolher diversos métodos, desde os convencionais até as metodologias mais modernas, para realização de testes de sensibilidade. Entre os mais utilizados pode-se citar os métodos de difusão em disco, microdiluição em caldo, diluição em ágar, metodologia do E test e métodos automatizados, sendo o método de difusão em discos (ou teste Kirby-Bauer) o mais utilizado (QUINN et al., 2007).

O método de difusão em disco tem como vantagem a sua simplicidade de execução, flexibilidade na escolha dos antimicrobianos, seu baixo custo, sua constante padronização pelo CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*), não necessitar de equipamento especial, e sua fácil interpretação pelos clínicos. Sua maior limitação é não poder ser utilizado para algumas espécies bacterianas, fornecer somente resultados qualitativos e não fornecer a concentração inibitória mínima (CIM ou MIC) (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Os discos de antimicrobiano preparados comercialmente devem ser conservados refrigerados (2 a 8 graus) ou congelados (abaixo de -10 °C). Antes de serem utilizados, deve-se deixá-los à temperatura ambiente por cerca de duas horas, pois a abertura precoce dos mesmos causa condensação de água no interior do frasco, aumento da umidade e consequente inativação do antibiótico com queda em sua atividade (LABORCLIN, 2011).

Um meio de cultura líquido, crescido com a bactéria isolada que será testada, deve ser diluído até se obter uma leitura de turbidez de 0,5 na escala de McFarland. Alternativamente, quatro ou cinco colônias de crescimento bacteriano puro podem ser diretamente suspensas em caldo ou solução salina (LABORCLIN, 2011).

A inoculação bacteriana é feita, utilizando-se um suabe de algodão estéril. O meio de cultura, geralmente Muller Hinton é semeado uniformemente em toda superfície, de forma que todos os espaços sejam preenchidos e o crescimento ocorra sobre todo o meio de cultura (VERMELHO et al., 2014). Após esse procedimento, discos comerciais de papel filtro impregnados com quantidades padronizadas de diversos antimicrobianos, com concentrações conhecidas, são aplicados sobre a superfície da placa de ágar, previamente semeada com inóculo padronizado do micro-organismo a ser testado (LABORCLIN, 2011; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Quinze minutos após a colocação dos discos, as placas devem ser incubadas invertidas a uma temperatura de 37°C por 18 a 24 horas para permitir o crescimento da bactéria e também para que os antimicrobianos possam se difundir no interior do ágar, formando uma espécie de gradiente de concentração da droga ao redor dos discos, de modo que a concentração do antimicrobiano decresce à medida que se distancia do disco (VERMELHO; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; MADIGAN; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

Após 18 a 24 horas de incubação, procede-se a leitura dos halos de inibição, utilizando-se um régua milimetrada (TRABULSI E ALTERTHUM, 2008). Se um organismo é suscetível a um antibiótico, uma zona clara aparece ao redor do disco, onde o crescimento do organismo foi inibido. O tamanho dessa zona de inibição depende da sensibilidade da bactéria a um antibiótico específico e da habilidade de difusão do antibiótico contido no disco através do ágar (VERMELHO et al., 2014).

Assim, o halo de inibição é medido e categorizado, de acordo com os critérios estabelecidos por documentos padronizados. Diversos documentos para padronização e interpretação do antibiograma estão disponíveis. No Brasil, os mais rotineiramente adotados são Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI e o European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – Eucast (LABORCLIN, 2015)

De modo geral, os resultados dos testes de avaliação de sensibilidade aos antimicrobianos, podem ser divididos em três categorias interpretativas:

- Sensível, o que em geral significa que a infecção devida ao micro-organismo estudado pode ser adequadamente tratada com a dosagem habitual do antimicrobiano testado e recomendado para este tipo de infecção.
- Intermediário, significa que o micro-organismo pode ser inibido por concentrações atingíveis de certas drogas se doses maiores puderem ser administradas ou se a infecção ocorre em local que o antimicrobiano é fisiologicamente concentrado (trato urinário, por exemplo).
- Resistente, quando o isolado não é inibido pela concentração do antimicrobiano obtida no local da infecção ou quando o micro-organismo patogênico apresenta mecanismos específicos de resistência.

(TRABULSI; ALTHERTUM, 2008).

Os objetivos deste teste são detectar possível resistência ao medicamento em patógenos comuns e assegurar a suscetibilidade a drogas de escolha para infecções específicas. O antibiograma liberado pode fornecer dados para ajudar o clínico a decidir as drogas de escolha ou, ainda, as doses dos agentes antimicrobianos adequadas ao tratamento da infecção (LABORCLIN, 2015).

2.8 CIM (concentração inibitória mínima)

Neste método são usadas diluições dos antimicrobianos. O objetivo é definir qual a menor concentração de um antimicrobiano capaz de inibir completamente o crescimento do organismo testado *in vitro* (VERMELHO et al., 2014; MADIGAN et al., 2016). A MIC é

determinada pela preparação de uma sequência de concentrações decrescentes de um fármaco em um caldo seguida da inoculação com a micro-organismo (que pode ser uma bactéria ou fungo) a ser testado (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

A escolha do número de concentrações a serem testadas varia de acordo com o antimicrobiano, com a espécie do micro-organismo e, eventualmente, com o local da infecção (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Para esta técnica, utiliza-se uma placa de microdiluição com 96 poços. Uma suspensão do microrganismo deve ser preparada em meio de cultura, sendo sua concentração ajustada para 0,5 na escala McFarland por comparação visual através de um tubo de ensaio comercial com turbidez padronizada. Devem ser pipetados 50 µl de suspensão do micro-organismo em cada poço, aos quais são acrescentados 50 µl de uma determinada concentração do antimicrobiano, totalizando 100 µl de volume no poço. As diluições de antimicrobianos comumente colocadas em cada poço da microplaca são: 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 e 0,25 µl/mL. As placas devem ser incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 18 a 24 horas. A leitura da turbidez é realizada em espectrofotômetro (MADIGAN et al., 2016; VERMELHO et al., 2014).

A vantagem dessa metodologia é a formação de resultados quantitativos, ou seja, informação da concentração inibitória mínima (MIC) dos agentes antimicrobianos diante do micro-organismo testado, além de ser um método padronizado e aceito para avaliação da sensibilidade de micro-organismos anaeróbios e algumas espécies fastidiosas que não poderiam ser corretamente avaliadas pela metodologia da difusão em disco. Entretanto, as metodologias que proporcionam resultados de concentração inibitória mínima (MIC) nem sempre são mais úteis para o clínico. Assim, devem ser escolhidas em situações clínicas especiais ou na detecção mais precisa de resistência de certos micro-organismos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

2.9 Animais silvestres e exóticos

O Brasil é o quarto maior país em população total de animais de estimação, tendo aproximadamente 54,2 milhões de cães, 39,8 milhões de aves, 23,9 milhões de gatos, 19,1 milhões de peixes, e mais 2,3 milhões de répteis e pequenos mamíferos, segundo estimativa do Instituto Pet Brasil (IPB) para o ano de 2018 (GERALDES, 2019). Observa-se, assim, um crescente interesse da população em possuir como animais de companhia não somente cães e gatos, mas também animais silvestres e exóticos, representados por pequenos mamíferos (coelhos, porquinhos-da-índia), aves (periquitos, calopsitas), répteis (iguanas, jabutis) e peixes ornamentais (peixe-betta, neon cardinal) (WERTHER, 2004).

As aves são classificadas em muitas ordens, conforme diversos critérios, dentre os quais, hábito alimentar, tipo de bico e de pé. As nove principais ordens são: Reiformes; Ciconiformes; Anseriformes; Psitaciformes; Passeriformes; Galiformes; Columbiformes; Falconiformes; e Estrigiformes. No Brasil, os psitaciformes e passeriformes são muito populares como animais de estimação, provenientes tanto de criações regularizadas, quanto de comércio ilegal (FRAGA, 2014).

Os Passeriformes compreendem a ordem de aves mais abundante em todo o mundo, sendo distribuídas em aproximadamente 45 famílias, dentre as quais 38 ocorrem no Brasil, (CUBAS; SILVA; CATÃO-DIAS, 2014). Essas aves são apreciadas por suas habilidades canoras e por serem consideradas capazes de tornar-se animais de estimação (PREUSS; SCHAEGLER 2011).

Já a ordem Psittaciforme também possui muitos representantes no Brasil. Essas aves são as mais frequentemente mantidas como animais de estimação, devido a sua natureza sociável, inteligência, coloração exuberante e capacidade de imitar sons. A ordem psitaciformes é subdivida em duas famílias, Psittacidae e Cacatuidae, sendo o Brasil considerado o país mais rico em representantes da família Psittacidae. As aves que pertencem à essa família são representadas pelas araras, periquitos e papagaios, que são conhecidas como aves de “bico redondo” (CUBAS; SILVA; CATÃO-DIAS, 2014; SICK, 1997). Em relação à família Cacatuidae, a calopsita é a espécie mais representativa, sendo a segunda espécie de psitaciforme mais criada no mundo como animal de estimação, perdendo somente para o periquito australiano (*Melopsittacus undulatus*) (SILVEIRA, 2012).

Os pequenos mamíferos e os peixes ornamentais também têm sido criados como animais de companhia, tendo sua quantidade aumentada a cada ano no Brasil. Em comparação aos dados do IBGE, do ano de 2013, os peixes obtiveram 6,1% de alta no ano de 2018, seguido por répteis e pequenos mamíferos, que registraram alta de 5,7%, (GERALDES, 2019). Isso pode ser visualizado pela maior quantidade de atendimento desses animais na clínica de animais silvestres e pelo maior número de amostras recebidas em laboratórios de diagnóstico, como no de microbiologia.

A aquariofilia, que faz parte do “Mercado Pet” é um segmento que tem crescido em todo o mundo. No Brasil, a produção de peixes ornamentais, uma das mais lucrativas da piscicultura nacional, tem sido fundamentada, principalmente, na reprodução de espécies exóticas. Dentre as mais comercializadas, destaca-se o peixe *Betta splendens* um Perciforme, da família Osphronemidae, que tem origem asiática (FARIA, 2018; LAMI, 2009). Dentre as características que atraem as pessoas para compra de peixe-betta destacam-se sua coloração e

conformação da cauda, principalmente nos machos, que apresenta grande exuberância; além de ser um animal de estimação relativamente resistente e de fácil cuidado, necessitando de pequeno espaço para ser mantido, quando comparado a outras espécies (SANTILLÁN, 2007).

Em relação ao coelho (*Oryctolagus cuniculus*), esse é um mamífero da ordem lagomorpha, da família Leporidae, cuja procura como animal de estimação tem crescido anualmente. A preferência por coelhos é explicada por serem animais educados e dóceis com seus donos, fáceis de manejar, baratos de manter, facilmente adaptáveis a diversos ambientes, por ocuparem pouco espaço, além de fazerem menos barulhos, quando comparado a outras espécies, como o cão (HEKER, 2015; FALCONE; KLINGER; TOLEDO, 2017).

Devido a criação em cativeiro, os animais ficam susceptíveis a diversos tipos de doenças, destacando-se as doenças infecciosas.

2.9.1 Psittaciformes

Inúmeras são as doenças bacterianas que afetam as aves ornamentais, sejam como agentes primários ou secundários. Nas aves, as bactérias Gram-negativas são consideradas mais patogênicas em relação às Gram-positivas, sendo estas geralmente agentes oportunistas em animais imunodeprimidos, tendo menos importância como agentes primários (CUBAS; GODOY, 2004).

Os psitacídeos são sensíveis a diversas doenças causadas por diferentes vírus, bactérias, fungos e parasitas. Dentre os agentes bacterianos, os que mais afetam psitacídeos mantidos em cativeiro são *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Klebsiella* sp., *Proteus* sp., *Bordetella* sp., *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Mycobacterium* sp., *Chlamydophila psittaci*, e *Mycoplasma* sp. Já os agentes fúngicos mais comuns de serem isolados são *Candida albicans*, *Macrorhabdus ornithogaster*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus* sp. (CUBAS; GODOY, 2009).

Dessas, as bactérias da Família Enterobacteriaceae são as principais responsáveis por causar infecções intestinais e extra-intestinais em aves imunocomprometidas. Assim, os psitacídeos podem ser afetados por bactérias oportunistas como *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus* e *Citrobacter* ou por bactérias consideradas zoonóticas como *Escherichia coli* e *Salmonella* que também podem ser transmitidas para outros animais (LOPES, 2016).

Em um estudo realizado por Godoy e Matushima (2001), em São Paulo, foram necropsiadas 26 diferentes espécies de Psitacídeos, sendo 18 espécies brasileiras e 7 espécies exóticas. Dos 130 animais necropsiados, os processos infecciosos foram responsáveis pelo maior número de óbitos, totalizando 60,8% dos casos. Os agentes bacterianos foram

relacionados ao óbito de 30,8% das aves, seguidos por agentes parasitários (16,1%), clamídias (5,4%), agentes fúngicos (3,1%) e virais (1,5%).

No trabalho realizado por Corrêa (2012), em Santa Maria, RS, foram relatadas as principais enterobactérias isoladas de psitacídeos mantidos em criadouro conservacionista utilizando-se amostras de suabes cloacais. As bactérias encontradas foram *Escherichia coli* (40%), *Serratia odorífera* (26,9%), *Enterobacter aerogenes* (10%), *Salmonella* spp. (6,6%), *Proteus vulgaris* (6,6%), *Providencia* spp. (3,3%), *Serratia liquefaciens* (3,3%) e *Klebsiella oxytoca* (3,3%).

Maia (2009), na cidade de Fortaleza, CE, avaliou 60 calopsitas quanto a presença de leveduras, utilizando material coletado da cavidade oral, da cloaca, e do inglúvio. A cavidade oral (53,33%) e o inglúvio (58,33%) foram os sítios com maior prevalência e maior número de isolados de leveduras. Das treze espécies isoladas, 32,5% eram *Candida albicans*, sendo a espécie mais prevalente, seguida de *C. tropicalis* (20%) e *Trichosporon asteroides* (12,5%).

Em outro estudo, realizado por Lima (2016) em Fortaleza, CE, foram colhidas amostras de suabes cloacais de calopsitas (*Nymphicus hollandicus*). As bactérias isoladas pertenciam aos gêneros *Pantoea*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Escherichia coli*, *Providencia* spp., *Enterobacter* sp, *Shigella*, *Proteus* e *Pseudomonas*, sendo *Pantoea agglomerans* a mais prevalente. Na mesma cidade, Machado et al. (2016) também isolaram enterobactérias, mas em amostras de suabe cloacal de periquito cara-suja (*Pyrrhura griseipectus*). As três bactérias de maior isolamento corresponderam à *Escherichia coli*, com quatro cepas (28,6%), *Pantoea agglomerans* e as do gênero *Klebsiella*, ambas com três cepas (21,4%). Quanto ao gênero *Enterobacter*, foram quantificadas duas cepas (14,3%) e um único isolamento de *Serratia* spp. (7,2%) e *Hafnia alvei* (7,2%).

Em um estudo realizado por Lamb et al. (2014), Nos Estados Unidos, foram retiradas amostras de pele de 75 psitacídeos saudáveis, compreendendo 25 papagaios cinzentos (*Psittacus erithacus*), 25 periquitos (*Melopsittacus undulatus*) e 25 calopsitas (*Nymphicus hollandicus*). As amostras foram retiradas da região axilar e cultivadas. Os organismos bacterianos mais frequentemente identificados pertenciam ao gênero *Staphylococcus* seguido por *Corynebacterium*.

2.9.2 Passeriformes

Em um estudo realizado por Godoy (2006), em São Paulo, foi feita a necropsia de 360 aves oriundas do tráfico, e constatou-se que os processos infecciosos foram responsáveis pela morte de 78,6% dos animais, apreendidos no município de São Paulo. Do total, as infecções

virais foram responsáveis pelo maior número de perdas, ou seja, 38,2% seguida por processos fúngicos (23%); processos parasitários (18,3%); processos infecciosos mistos (13,8%); processos bacterianos (3,5%) e causas indeterminadas (3,2%).

Sanches (2008) também realizou a necropsia de passeríformes no município de São Paulo, totalizando 149 aves, sendo 42,3% de vida livre e 57,7% oriundas do tráfico. Nesse caso, os processos infecciosos foram responsáveis pelo óbito de 51, 17% das aves provenientes do tráfico, principalmente devido à infecções mistas por bactérias e fungos; e foram responsáveis pelo óbito de 24,42% das aves de vida livre, que tiveram como principal causa de óbito o traumatismo. Os agentes microbianos isolados com maior prevalência foram *Escherichia coli* e *Candida albicans*.

Marinho et al. (2010) avaliaram a microbiota fúngica de passeríformes criados em cativeiro no estado de São Paulo. Foi verificada a presença de 25% de *Penicillium* spp., 19,4% de *Trichosporon* spp., 13,9% de *Cryptococcus gattii*, 11,1% de *Cryptococcus neoformans*, 11,1% de *Candida* spp., 8,3% de *Rhizomucor* spp., 8,3% de *Aspergillus* spp., 2,8% de *Nigrospora* spp. e 2,8% de *Geotrichum* spp.

Em outro estudo, feito por Braconaro (2012), em São Paulo, foram analisados suabes cloacais de passeríformes apreendidos do tráfico, os quais foram soltos posteriormente. Houve crescimento microbiano em 62,5% das culturas, sendo que em 48,6% houve somente crescimento bacteriano, em 1,6% somente crescimento fúngico e em 12,3% houve crescimento de fungos e bactérias. Os gêneros de microrganismos de maior ocorrência foram *Staphylococcus*, spp., *Micrococcus* spp., *Escherichia* sp., e *Klebsiella* spp., seguidos por *Bacillus* spp., *Streptococcus* spp e *Candida* spp. As bactérias Gram-positivas representaram 60,7% do total de amostras positivas.

2.9.3 Perciforme

Muitos dos patógenos que causam doenças nos peixes estão continuamente presentes na água, substrato, ar ou mesmo nos próprios animais. Sob condições ambientais favoráveis, os peixes são resistentes à maioria desses patógenos, porém, quando submetidos a condições estressantes, como má qualidade da água, alta densidade de estocagem, transporte, lesões traumáticas e alimentação inadequada, essa resistência é quebrada (FARIA et al., 2006).

As bactérias Gram-negativas são reconhecidas como agentes causadores de muitas doenças bacterianas que atacam peixes ornamentais. São usualmente isoladas *Aeromonas* sp., *Citrobacter* sp, *Flavobacterium* sp, *Edwardsiella* sp, *Mycobacterium* sp, *Pseudomonas* sp e *Vibrio* sp. (MUSA et al., 2008; ROBERTS; PALMEIRO; WEBER, 2009). Já as bactérias

Gram-positivas mais comuns que causam doenças em peixes são *Streptococcus* spp; e outros gêneros gram-positivos que estão intimamente relacionados ao *Streptococcus* spp., que incluem *Lactococcus* sp., *Enterococcus* sp. e *Vagococcus* sp. (ROBERTS; PALMEIRO; WEBER, 2009). Em um estudo realizado por Leme et al. (2011), foram identificados fungos patogênicos em peixes fluviais. As culturas mostraram que a maioria das leveduras eram do gênero *Candida* spp., mas foram também identificados *Phoma* spp. e *Yarrowia lipolytica*.

No ano de 2014, na cidade de Mossoró, RN, foi identificada uma bactéria Gram-negativa denominada *Alcaligenes faecali*, em uma fêmea de peixe-betta de 6 anos de idade. O animal apresentava despigmentação, perdas de escamas do epitélio e aumento de volume na região lateral esquerda. Na necropsia constatou-se que o animal também apresentava exoftalmia bilateral, opacidade de córnea, ascite e um abscesso (OLINDA et al., 2014).

2.9.4 Lagomorpha

As doenças que mais comumente afetam os coelhos são as do trato respiratório e as intestinais. Muitas dessas doenças estão presentes na colônia de forma subclínica e podem aparecer como surtos em consequência do estresse. Os agentes das doenças de origem bacteriana incluem *Pasteurella multocida*, *Bacillus piliformis*, *Bacillus fusiformis*, *Salmonella* sp., *Yersinia pseudotuberculosis*, *Treponema cuniculi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus* sp e *Streptococcus* sp. E os agentes fúngicos mais comuns são o *Trychophyton* spp e *Microsporum* spp. (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002; FALCONE; KLINGER; TOLEDO, 2017).

Várias doenças comuns em coelhos podem apresentar como causa primária ou secundária, a contaminação por agentes microbianos. Uma doença que ocorre com frequência é a enterite, em que os principais agentes etiológicos envolvidos são *Escherichia coli*, *Clostridium spiroforme*, *Clostridium piliforme* e *Salmonella typhimurium* e *Salmonella enteritidis*. Em relação às infecções bacterianas do trato urinário, as bactérias patogênicas isoladas com mais frequência são *E. coli*, *Klebsiella* sp. e *Pseudomonas* sp. (QUINTON, 2005).

Em relação à bactéria *Pasteurella multocida*, esta é um habitante comensal do trato respiratório superior e digestivo dos coelhos. Porém, devido a fatores estressantes como prenhez, lactação, manejo incorreto e alta densidade populacional, a resistência corpórea diminui, favorecendo o aparecimento de infecção (MAKINO; NAKAGH, 2005).

A *Pasteurella multocida*, costuma ser responsável por causar diversas doenças em coelhos, podendo estar associada a casos de metrite em coelhas; estar presente em secreção de abscessos, os quais são relacionados à infecções generalizadas; causar otite, uveíte aguda e

conjuntivite crônica; e causar distúrbios respiratórios. Frequentemente está associada à outras bactérias, como *Staphylococcus aureus* (QUINTON, 2005).

Em um estudo, realizado por Cooper, Mclellan e Rycroft (2001), na Inglaterra, foram coleados suabes conjuntivais de ambos os olhos de 70 coelhos domésticos sadios para verificar o crescimento de microrganismos. As espécies de *Staphylococcus* (57%) foram os organismos mais comumente recuperados, seguidos por *Micrococcus* sp. (25%) e *Bacillus* sp. (19%). Outros organismos isolados incluíram o *Stomatococcus* sp. (8%), *Neisseria* sp. (8%), *Pasteurella* sp. (6%), *Corynebacterium* sp. (6%), *Streptococcus* sp. (6%) e *Moraxella* sp. (4%).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Descrever as ações do estágio curricular obrigatório de término de curso no laboratório de microbiologia veterinária da UFERSA.

3.2 Objetivos Específicos:

- Descrever os procedimentos realizados em laboratório;
- Apresentar a casuística referente aos diagnósticos microbiológicos de amostras recebidas da clínica de animais silvestres e exóticos;
- Relatar um caso de *Candida albicans* em *Nymphicus hollandicus*.

4 INFRA-ESTRUTURA DO LABORATÓRIO E DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES

O laboratório de microbiologia veterinária (LAMIV) está localizado na Universidade Federal Rural do Semi-árido, na cidade de Mossoró, no campus oeste, tendo funcionamento em dois turnos. O estágio teve como orientador o professor Francisco Marlon Carneiro Feijó e a supervisão foi realizada pelo técnico Caio Sergio Santos.

O LAMIV é classificado como nível um de biossegurança, e é dividido da seguinte forma: área de esterilização, sala de identificação de fungos filamentosos e leveduras, área de identificação de bactérias, perfazendo um total de 42 m²:

Sala 1 - Sala de identificação de bactérias

A sala de identificação de bactérias (figura 1) contém uma bancada para a realização dos testes, experimentos e preparação de materiais. Sobre a bancada há um microscópio óptico para visualização dos micro-organismos. Há também vários armários distribuídos pela sala, fixados tanto na parte superior das paredes quanto na parte inferior. Neles, são armazenados diversos materiais utilizados em laboratório, como tubos de ensaio, erlenmeyer, béqueres, provetas, pipetas e meios de cultura.

Sobre os armários, dispostos na parte inferior, ao longo de 6 metros, fica uma bancada que contém: um forno micro-ondas e um fogão de bancada, ambos para aquecimento dos meios de cultura; uma capela de fluxo laminar, para manipulação de materiais em ambiente estéril, quatro estufas, sendo duas para o fornecimento de uma temperatura ideal ao crescimento dos micro-organismos cultivados e outras duas para secagem de materiais; equipamento para banho-maria, utilizado para aquecer substâncias de forma lenta e uniforme; uma centrífuga, que faz a separação de amostras por meio de rotação; uma jarra de anaerobiose, que permite o crescimento de micro-organismos anaeróbicos em atmosfera de CO₂ ou H₂; uma balança analítica de precisão, para pesagem dos meios de cultura; e um espectofotômetro, que mede a quantidade de fótons (intensidade de luz) absorvida depois de passar por uma amostra.

Há também uma pia para lavagem de materiais limpos e para realizar a antisepsia das mãos; um computador onde são digitados e emitidos os laudos; e quatro refrigeradores, sendo um destinado ao armazenamento de amostras contaminadas, e outros três que estocam os meios de cultura, discos de antibiograma, antimicrobianos e reagentes utilizados nos testes de diagnóstico.

Figura 1 – Sala de identificação de bactérias



Fonte: arquivo pessoal

Área de esterilização

A área de esterilização contém uma autoclave, que é utilizada tanto para esterilização de materiais limpos quanto contaminados (Figura 2).

Figura 2 - Autoclave



Fonte: arquivo pessoal

Sala 2 – Sala de identificação fúngica

A sala de identificação fúngica (figura 3) contém uma capela de fluxo laminar para manipulação de culturas fúngicas. Também é onde ocorrem as aulas práticas de microbiologia, havendo diversos microscópios ópticos distribuídos sobre uma bancada. Além disso, contém uma pia destinada à lavagem de materiais sujos após a esterilização em autoclave, para posterior reutilização. Ademais, há uma estufa incubadora BOD (demanda bioquímica de oxigênio) para incubação de culturas fúngicas em uma área anexada a sala de identificação de fungos.

Figura 3 – sala de identificação fúngica



Fonte: arquivo pessoal

4.1 Descrição das atividades

O estágio supervisionado obrigatório teve início no dia 03 de junho de 2019 e término no dia 31 de Julho de 2019, totalizando 240 horas. As atividades foram realizadas no laboratório de microbiologia veterinária (LAMIV) da Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA) sendo realizadas as seguintes atividades: recepção de material; preparo de meios de cultura; autoclavação de materiais limpos; identificação dos microrganismos, que poderiam ser fungos ou bactérias, por meio de citologia, cultivo e provas bioquímicas; realização de antibiograma; autoclavação de materiais sujos e descarte de lixo biológico.

4.1.1 Preparo dos meios de cultura

Para o preparo dos meios de cultura foram utilizados equipamentos de proteção individual (EPI's) como jaleco e luvas de procedimento. A pesagem do meio comercial, que

apresentava-se sob a forma de pó, foi feita em balança analítica de precisão de acordo com as recomendações do rótulo. Em seguida, o meio foi adicionado a uma vidraria adequada, como erlenmeyer ou béquer, e hidratado em pequena quantidade de água destilada até que ficasse úmido. Após, o meio foi firmemente agitado por alguns segundos, até se obter uma suspensão homogênea, para depois adicionar o restante da água destilada ao recipiente. Os recipientes foram tampados com papel alumínio e papel jornal e selados com barbante para serem esterilizados em autoclave.

Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave juntamente com outros materiais como placas de Petri devidamente embaladas, tubos de ensaio tampados com algodão, ponteiros, etc., sendo o tempo de esterilização para materiais limpos de 15 minutos, a temperatura de 121°C e pressão de 1 atm.

Após o término da esterilização, os materiais foram retirados da autoclave com auxílio de luvas térmicas. Os meios de cultura foram então levados para a capela de fluxo laminar para serem vertidos nas placas de Petri estéreis, se fossem sólidos, ou em tubos de ensaio estéreis, se fossem líquidos. Em seguida, foram armazenados em refrigerador à temperatura entre 2 a 8°C para posterior utilização. Devido à chance de ocorrer desidratação, os meios em placas foram embalados em papel filme, para minimizar a perda de umidade, e estocados em posição invertida. Todos os meios foram levados à temperatura ambiente antes de seu uso.

4.1.2 Recepção do material

O recebimento das amostras foi realizado somente quando estas estavam armazenadas adequadamente em recipiente estéril, como tubo “eppendorf”, e devidamente identificadas com o número do registro geral (RG) do animal e acompanhada de requisição do médico veterinário responsável (Figura 4). Na requisição constava-se o RG do animal, nome, idade, espécie, raça, sexo, nome do tutor, data da realização do exame, suspeita clínica e local de onde o material foi coletado. As amostras provenientes da clínica médica de animais silvestres foram levadas imediatamente após a coleta para o LAMIV. Aquelas que não poderiam ser processadas rapidamente foram armazenadas em refrigerador à temperatura entre 2 a 8°C por até 2 horas para posterior manipulação.

Figura 4 –Requisição do médico veterinário

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO – UFERSA
HOSPITAL VETERINÁRIO DIX-HUIT ROSADO MAIA – HOVET – (84) 3317-8310
SOLICITAÇÃO DE EXAMES – LABORATÓRIO CLÍNICO

RG Nº: ASD19/184

Proprietário: _____ Data: 05/06/2019
Nome do Animal: Superação Espécie: P. DOMINICANA Raça: _____
Sexo: _____ Idade: 1 anos 4 meses
Suspeita clínica: Diarréia por ascaridíase

Hematologia	☐ Alanina Aminotransferase (ALT/TGP)	☐ Glicose
☐ Hemograma	☐ Amilase	☐ Hemoglobina Glicosilada
☐ Eritrograma	☐ Aspartato Aminotransferase (AST/TGO)	☐ Proteínas Totais
☐ Leucograma	☐ Bilirrubina	☐ Proteinograma
☐ Contagem de Plaquetas	☐ Cálcio	☐ Triglicérides
☐ Fibrinogênio	☐ Colesterol	☐ Uréia
☐ Tempo de Protrombina (TP)	☐ Colinesterase	
☐ Tempo Trombop. Parcial At. (TTPA)	☐ Creatinafosquinase (CK)	Outros
☐ Pesquisa de Hemoparasitas	☐ Creatinina	☐ Urinálise Completa
☐ Pesquisa de Leishmania	☐ Dehidrogenase Láctica (LDH)	☐ Urina - Físico-química
Bioquímica Sérica	☐ Fosfatase Ácida	☐ Efusão
☐ Ácido Láctico	☐ Fosfatase Alcalina	☐ Líquido Cefalorraquidiano
☐ Ácido Úrico	☐ Fósforo (fosfato)	☐ Fluido Ruminal
	☐ Gama Glutamiltransferase (GGT)	☒ cultura fúngica

Observações: Cárie retirada de que maxil. bactéria e anti-tuberculose

Médico Veterinário
CRMV-PB 16855

Fonte: arquivo pessoal

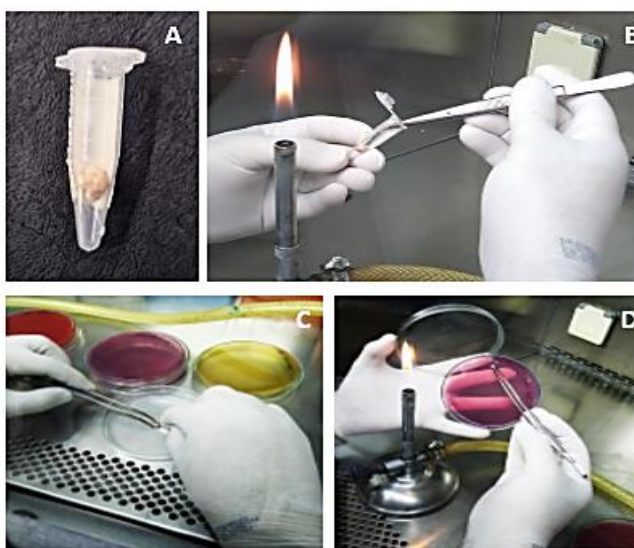
4.1.3 Processamento das amostras recebidas

As amostras, em sua maioria, foram de transudatos e exsudatos caseosos. O processamento destes materiais foi feito em capela de fluxo laminar, após a descontaminação com luz ultravioleta (UV). Os meios de cultura adequados para o crescimento bacteriano, que poderiam ser ágar Brain Heart Infusion (BHI) ou ágar sangue de sangue de carneiro (5%) e ágar MacConkey, foram utilizados para o isolamento dos micro-organismos. Já para o crescimento de culturas fúngicas, foi utilizado o ágar Sabouraud-dextrose acrescido de cloranfenicol (50ug/ml).

Com a chama do bico de Bunsen ligada, os transudatos que estavam dentro de tubos “ependorf” eram manipulados com auxílio de uma pinça para realização do cultivo, semeando-se a amostra primeiro no ágar BHI ou ágar sangue de carneiro (5%), depois em ágar MacConkey e posteriormente em ágar Sabouraud-dextrose acrescido de Cloranfenicol (50ug/ml).

O mesmo procedimento foi feito com os exsudatos caseosos, porém, estes foram colocados em uma placa de Petri estéril de 10mm x 90mm, e em seguida, cortados com lâmina de bisturi estéril para que somente a parte interior do exsudato caseoso fosse semeada (Figura 5). Os meios de cultura bacterianos semeados foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C graus por um período de 24 a 48 horas. E o meio de cultura fúngico foi armazenado em estufa incubadora BOD (demanda bioquímica de oxigênio), a 28°C, por um período de até quatro semanas.

Figura 5 – Processamento da amostra. (A) exsudato caseoso contido em tubo “eppendorf”, (B) manipulação do exsudato caseoso, com auxílio de pinça, próximo a chama do bico de Bunsen, (C) fragmentação da amostra, com auxílio de bisturi estéril, em placa de Petri estéril (D) semeadura da amostra em meio de cultura ágar MacConkey.



Fonte: arquivo pessoal

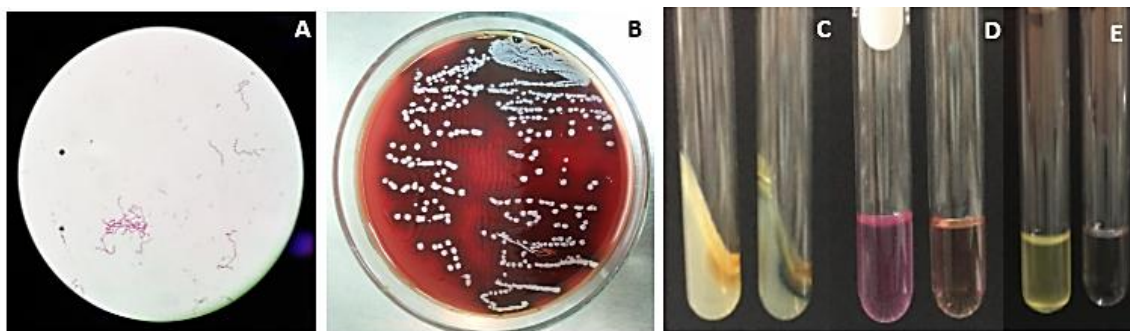
4.1.4 Identificação de bactérias

Após o período de incubação, foi observado o crescimento de colônias bacterianas. As amostras muito contaminadas, ou seja, aquelas que apresentavam crescimento de diversas colônias, foram descartadas. Se houvesse crescimento de até duas colônias utilizava-se aquela mais prevalente. As características da colônia foram anotadas de acordo com o aspecto, textura, cor, bordos, concavidade e odor (como no caso de *Pseudomonas aeruginosa*, que tem um odor adocicado característico).

Em seguida, a cultura foi levada para capela de fluxo laminar para que fosse feita a citologia da amostra. Após flambar a alça de platina na chama do bico de Bunsen, coletava-se uma alíquota da colônia bacteriana, a qual era depositada em uma lâmina de vidro, devidamente limpa, e depois fixada pelo calor. Em seguida, foi feita a coloração de Gram e as características do micro-organismo foram vistas em microscópio óptico, no aumento de 1000 vezes, e anotadas quanto à forma, arranjo e coloração.

Por fim, duas amostras de colônia foram isoladas em dois diferentes tubos de ensaio contendo caldo BHI, uma para posterior utilização em provas bioquímicas e outra para realização de antibiograma (Figura 6). As bactérias isoladas foram identificadas de acordo com as características macro e microscópicas bem como por provas bioquímicas conforme descrito por MacFadiin (2004).

Figura 6 – Identificação bacteriana. (A) Citologia referente a *Streptococcus*, (B) cultura em ágar sangue em que se observa beta-hemólise, (C) prova de fenilalanina (positivo do lado direito e negativo do lado esquerdo) (D) prova de urease (positivo do lado esquerdo e negativo do lado direito) (E) prova de NaCl a 5% (positivo do lado esquerdo e negativo do lado direito).



Fonte: arquivo pessoal

4.1.5 Identificação de fungos

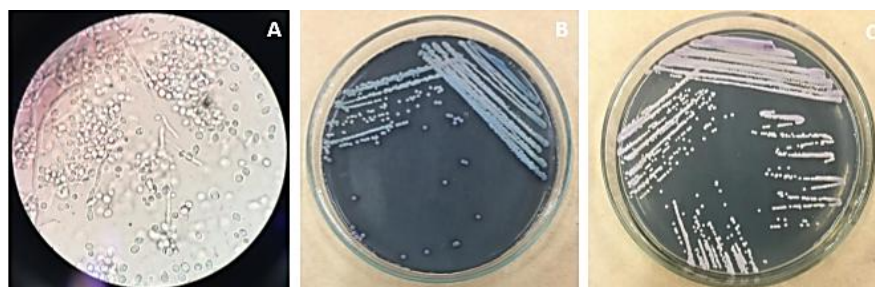
Após o período de incubação, foi observado se houve crescimento de colônia filamentosa ou glabra. As amostras muito contaminadas com fungos saprófitas foram descartadas, sendo somente as colônias puras utilizadas para análise. As características da colônia foram anotadas quanto a pigmentação (presença ou ausência, cor do pigmento, difuso, restrito à colônia), textura, cor do reverso, bordas (regulares, irregulares, radiadas), superfície (lisa, fissurada, rugosa), velocidade de crescimento, topografia (plana, convexa, umbilicada, pregueada, cerebriforme), e aspecto (brilhante, opaco, seco, úmido).

Os fungos podem formar colônias de dois tipos: leveduriformes e filamentosas. As colônias leveduriformes geralmente são pastosas ou cremosas e caracterizam o grupo das leveduras. Já as colônias filamentosas, característica dos bolores, podem ser algodonosas, aveludadas, pulverulentas, cotonosas, serosas, e com os mais variados tipos de pigmentação (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

As culturas fúngicas foram manipuladas na capela de fluxo laminar para realização da citologia. Com auxílio de uma pipeta Pasteur, foi colocada uma gota de azul de algodão sobre

uma lâmina de vidro, devidamente limpa. Após flambar a alça de platina na chama do bico de Bunsen, foi distribuída uma porção da colônia sobre o corante azul de algodão e, em seguida, colocada uma lamínula por cima. As características do micro-organismo foram vistas em microscópio óptico no aumento de 200 a 400 vezes, e anotadas quanto às características do conídeo, presença de hifas e conidioforo. Os fungos filamentosos e leveduras isolados foram identificados de acordo com características macro e microscópicas (Figura 7), bem como por provas bioquímicas de acordo com Hoog e Guaró (1995).

Figura 7 – Identificação fúngica. (A) Citologia de levedura do tipo *Candida* sp., (B) cultura em ágar Chromagar em que se observa colônias de *Candida tropicalis* (C) cultura em ágar Chromagar em que se observa colônias de *Candida krusei*.



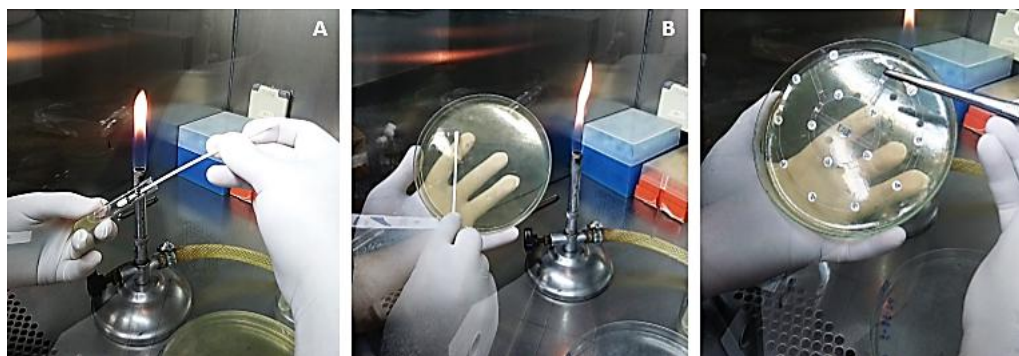
Fonte: arquivo pessoal

4.1.6 Antibiógrama

Os testes foram realizados em meio de cultura ágar Muller-Hinton, empregando-se o método de disco difusão, segundo a técnica de Bauer et al. (1996). Após ligar a chama do bico de Bunsen, a placa de Petri contendo o meio de cultura ágar Muller-Hinton foi levada até a capela de fluxo laminar. Com um suabe estéril, foi coletada uma amostra de cultura bacteriana que havia crescido em caldo BHI (com turvação de 0,5 da escala de MacFarland), e esse suabe foi semeado uniformemente por toda a placa.

Após esse procedimento, foi colocado o disco de sensibilidade, com auxílio de uma pinça, o qual foi levemente pressionado para assegurar o contato com a superfície do ágar (Figura 8). O meio de cultura foi incubado em estufa bacteriológica por 24 horas. A interpretação dos testes foi realizada pela medida do diâmetro do halo de inibição do crescimento do micro-organismo, utilizando-se uma régua milimetrada. A interpretação dos resultados foi feita com base na bula CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute), edição de 2019.

Figura 8 – Realização de antibiograma. (A) Coleta de uma alíquota de cultura bacteriana, cultivada em caldo BHI, utilizando-se suabe estéril, (B) distribuição uniforme do inóculo em meio de cultura Mueller Hinton (C) colocação de disco-difusão, contendo antimicrobianos, na superfície do meio de cultura.



Fonte: arquivo pessoal

4.1.7 Descarte de material biológico

Os materiais sujos foram esterilizados em autoclave à uma temperatura de 121°C e pressão de 1atm por 30 minutos. Após a retirada do material, o conteúdo foi descartado em lixo biológico, e os materiais foram posteriormente lavados e secados.

5 CASUÍSTICA

No Laboratório de Microbiologia Veterinária da UFERSA são recebidas amostras das clínicas de pequenos animais, grandes animais e animais silvestres. No entanto, neste trabalho, foi descrita somente a casuística referente aos animais silvestres e exóticos, por ter um quantitativo maior em relação ao total de amostras recebidas.

Durante o período de estágio, de 03 de Junho a 31 de Julho, foram recebidas amostras de 30 animais, dessas: 90% (27) eram de aves, 6,66% (2) de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*); e 3,33% (1) de peixe-betta (*Betta splendens*), conforme descrito na Tabela 1. As aves cujas amostras foram recebidas, pertenciam às ordens Psittaciforme e Passeriforme. Do total de aves 33,33% eram da espécie *Nymphicus hollandicus*, 13,33% *Agapornis* sp., 10% *Cyanocompsa brissonii*, 6,66% *Serinus Canaria*, 3,33% *Erythrura gouldiae*, 3,33% *Eupsittula cactorum*, 3,33% *Melopsittacus undulatus*, 3,33% *Paroaria dominicana*, 3,33% *Platycercus eximius*, 3,33% *Psittacula krameri*, 3,33% *Sporophila nigricollis*.

Tabela 1 – Relação das espécies animais cujas amostras foram enviadas para análise no Laboratório de Microbiologia Veterinária (LAMIV) dentro do período estudado.

Nome científico	Nome popular	Quantidade de animais	% em relação ao total de animais
Aves			
<i>Nymphicus hollandicus</i>	Calopsita	10	33,33
<i>Agapornis</i> sp.	Agapornis	4	13,33
<i>Cyanocompsa brissonii</i>	Azulão	3	10
<i>Serinus Canaria</i>	Canário	2	6,66
<i>Erythrura gouldiae</i>	Diamante-de-Gould	1	3,33
<i>Eupsittula cactorum</i>	Periquito-da-caatinga	1	3,33
<i>Melopsittacus undulatus</i>	Periquito-australiano	1	3,33
<i>Paroaria dominicana</i>	Cardeal-do-nosdeste	1	3,33
<i>Platycercus eximius</i>	Rosela	1	3,33
<i>Psittacula krameri</i>	Periquito-de-colar	1	3,33
<i>Sporophila caerulescens</i>	Coleirinho	1	3,33
<i>Sporophila nigricollis</i>	Coleiro-baiano	1	3,33
Peixe			

<i>Betta splendens</i>	Peixe-betta	1	3,33
Mamífero			
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Coelho	2	6,66

Em relação ao tipo de amostras recebidas 66,66% (20) eram transudato; 13,33 (4) exsudato caseoso; 6,66% (2) debris tegumentares; 6,66% (2) transudato e fragmento de fígado 3,33% (1) transudato e sangue; e 3,33% (1) líquido cavitário (Tabela 2).

Tabela 2 – Tipo de amostra recebida no LAMIV, dentro do período estudado.

Tipo de amostra	Quantidade	(%)
Transudato	20	66,66
Exsudato caseoso	4	13,33
Debris tegumentares	2	6,66
Transudato e fragmento de tecido	1	6,66
Transudato e sangue	1	3,33
Líquido cavitário	1	3,33

Do total de amostras (30), 21 amostras foram para realização de cultivo fúngico e bacteriano; 6 para cultivo fúngico e 3 para cultivo bacteriano. Das 24 culturas bacterianas observou-se crescimento microbiano em 18 amostras. Foram identificados 8 gêneros distintos de bactérias, sendo as do tipo Gram-negativas mais prevalentes (75%) em relação às gram-positivas (25%) (Tabela 3).

Tabela 3 – Quantitativo das amostras positivas e negativas para crescimento bacteriano, em relação à classe animal.

	Positivo	Negativo	Total
Aves	15	6	21
Mamíferos	2	0	1
Peixes	1	0	2
Total	18	6	24

Das espécies gram-negativas, *Pseudomonas aeruginosa* teve maior ocorrência (33,33%), seguida por *Escherichia coli* (11,11%), *Acinetobacter* sp. (11,11%), *Citrobacter*

freundi (5,55%), e *Proteus* sp (5,55%) e *Pasteurella* sp. (5,55%). Das espécies Gram-positivas destacou-se *Staphylococcus* sp. (22,22%), seguida de *Enterococcus* sp (5,55%) (Tabela 4).

Tabela 4 – Gêneros bacterianos identificados a partir de amostras recebidas no LAMIV, dentro do período estudado.

Gênero	Quantidade	Total (%)
<i>Pseudomonas</i> sp	6	33,33
<i>Staphylococcus</i> sp.	4	22,22
<i>Escherichia</i> sp.	2	11,11
<i>Acinetobacter</i> sp.	2	11,11
<i>Citrobacter</i> sp.	1	5,55
<i>Enterococcus</i> sp.	1	5,55
<i>Pasteurella</i> sp.	1	5,55
<i>Proteus</i> sp.	1	5,55
Total	18	100

Em relação ao total de 18 amostras positivas, foi solicitada realização de antibiograma em 12 casos. Pode-se observar 100% de resistência dos micro-organismos aos antimicrobianos amoxicilina/ácido clavulânico e Ampicilina. Houve também alta resistência (91,66%) a cefalotina e ao cefepime. Quanto a sensibilidade, houve 75% de sensibilidade dos micro-organismos ao antimicrobiano ciprofloxacina, e 50% aos antimicrobianos amicacina e piperacilina/tazobactam (Tabela 5).

Tabela 5 – Resultados do número absoluto e porcentagem dos testes de susceptibilidade *in vitro* de 12 amostras positivas para crescimento bacteriano, frente a 15 antimicrobianos.

Antimicrobiano	Sensível		Intermediário		Resistente	
	N	%	N	%	N	%
Amoxicilina/Ac. Clavulânico	0	0	0	0	12	100
Amicacina	6	50	2	16,66	4	33,33
Ampicilina	0	0	0	0	12	100
Aztreonan	3	23	1	8,33	8	66,66
Ceftazidima	1	8,33	1	8,33	10	83,33

Cefalotina	1	8,33	0	0	11	91,66
Cefoxitina	0	0	3	23	9	75
Ciprofloxacina	9	75	2	16,66	1	8,33
Cloranfenicol	3	23	1	8,33	8	66,66
Cefepime	1	8,33	0	0	11	91,66
Ceftriaxona	3	23	5	41,66	4	33,33
Gentamicina	5	41,66	3	23	4	33,33
Piperacilina/Tazobactam	6	50	0	0	6	50
Sulfazotrim	3	23	1	8,33	8	66,66
Tetraciclina	4	33,33	2	16,66	6	50

Do total de solicitações de diagnóstico fúngico (27), observou-se o crescimento em 6 amostras (Tabela 6).

Tabela 6 – Quantitativo das amostras positivas e negativas para crescimento fúngico, em relação à classe animal.

	Positivo	Negativo	Total
Aves	5	21	24
Mamíferos	0	0	0
Peixes	1	0	1
Total	6	21	27

Do total de amostras positivas, houve crescimento de *Candida* sp., sendo 33,33% *Candida krusei/Candida tropicalis*; 16,66% *Candida krusei*, 16,66% *Candida tropicalis*, 16,66%, *Candida albicans* e 16,66% *Candida* sp. (Tabela 7).

Tabela 7 – Espécies fúngicas identificadas das amostras recebidas no LAMIV, dentro do período estudado.

Gênero	Quantidade	Total (%)
<i>Candida krusei/Candida tropicalis</i>	2	33,33
<i>Candida tropicalis</i>	2	16,66
<i>Candida krusei</i>	1	16,66
<i>Candida albicans</i>	1	16,66

<i>Candida sp.</i>	1	16,66
Total	6	100

6 RELATO DE CASO

No dia 19 de Julho de 2019 foi atendida uma calopsita (*Nymphicus hollandicus*) no hospital veterinário Jerônimo Dix-Huit Rosado Maia, localizado na Universidade Federal Rural do Semi-árido, Campus Mossoró, RN, no setor de animais silvestres e exóticos. O animal tinha 3 meses de idade e pesava 94 gramas. Como sintomas apresentava crosta na comissura do bico (Figura 9) e secreção esbranquiçada na cavidade oral. No histórico, foi relatado que a lesão apareceu havia cinco dias, e que a tutora levou o animal para ser consultado em casa agropecuária, onde foi receitado um antisséptico tópico para aplicar na lesão, porém o paciente não apresentou melhora.

Assim, o médico veterinário residente que atendeu o animal optou por fazer um suabe da lesão. Para realização da coleta foi utilizado um suabe estéril, o qual foi friccionado pela lesão e pela secreção oral, e depois foi armazenado em tubo “eppendorf”. Após a coleta, o material foi imediatamente levado ao Laboratório de Microbiologia Veterinária da UFERSA para ser processado. Na requisição foi pedida a realização de cultura fúngica, pois a principal suspeita era de infecção por *Candida albicans*.

Figura 9 – Crosta em comissura de bico de ave da espécie *Nymphicus hollandicus* (círculo vermelho).



Fonte: arquivo pessoal

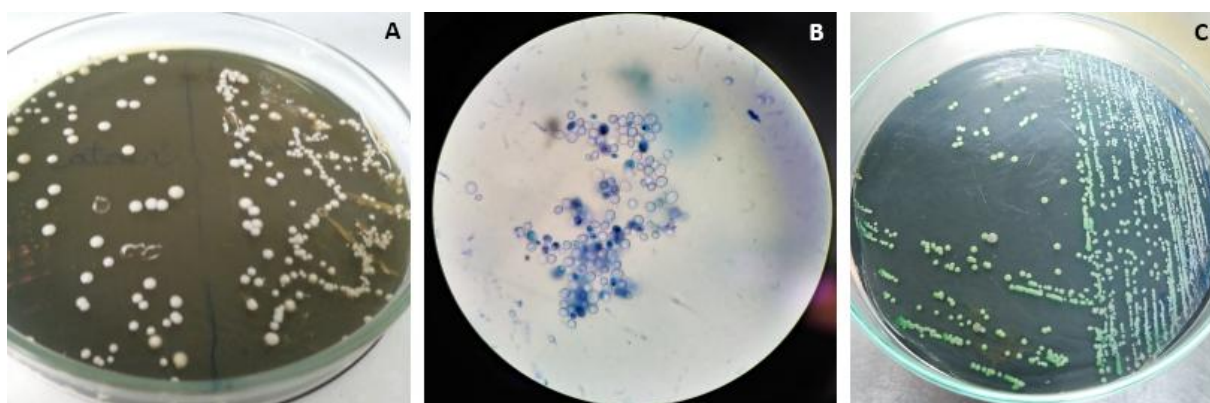
Já no laboratório, foi realizada a descontaminação do fluxo laminar com lâmpada UV por 5 minutos. Após acender a chama do bico de Bunsen, o meio de cultura ágar sabouraud-

dextrose, acrescido de cloranfenicol, foi levado junto ao suabe até a capela de fluxo laminar para ser feita a semeadura da amostra no meio de cultura.

Após 48 horas de incubação à temperatura de 28°C em incubadora BOD, foi observado crescimento de colônias brancas, lisas, brilhantes e com bordos regulares no meio de cultura (figura 10A). Para identificação do micro-organismo, inicialmente foi feita a citologia, na sala de identificação fúngica. Na capela de fluxo laminar, após ligar a chama do bico de Bunsen, foi utilizada uma lâmina de vidro limpa sobre a qual foi colocada uma alíquota da colônia, com auxílio da alça de platina. Após, foi adicionada uma gota de corante azul de algodão láctico, e em seguida, foi posta uma lamínula sobre a lâmina para posterior visualização em microscópio.

Com um aumento de 400 vezes, observou-se estruturas ovais semelhantes à *Candida* sp. (Figura 10B). Assim, para identificação da espécie, foi feita a cultura em Chromagar, prova bioquímica de fermentação de carboidratos e prova da coroa radiata em meio EMB. A amostra foi semeada em Chromagar e incubada em estufa bacteriológica a 37°C. Observou-se crescimento fúngico após 24 horas de incubação, em que as colônias apresentavam uma coloração esverdeada, característica da espécie *Candida albicans* (Figura 10C).

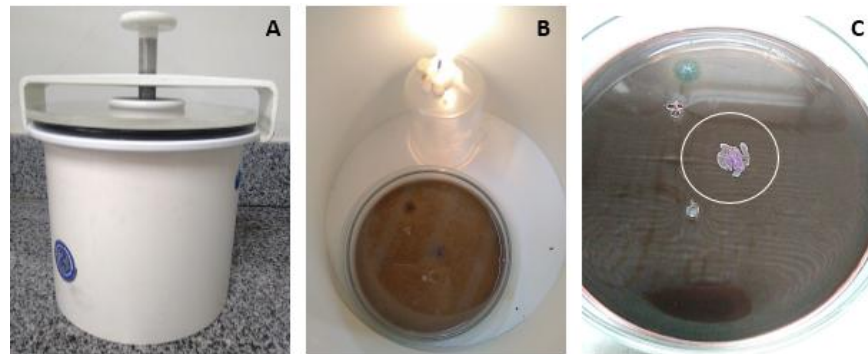
Figura 10 – (A) colônias de *Candida albicans* em meio de cultura ágar Sabouraud-dextrose acrescido de cloranfenicol, (B) citologia de *Candida albicans* corada com azul de algodão láctico, (C) colônias de *Candida albicans*, de coloração verde-claro, em ágar Chromagar.



Fonte: arquivo pessoal

Em relação ao cultivo realizado em EMB (eosina azul de metileno), foi inoculada *Candida* sp. no centro da cultura disposta em placa de Petri, a qual foi incubada em jarra de anaerobiose por um período de cinco dias. A colônia formada apresentou coloração lilás, de aspecto liso e não apresentou franja, como é descrito em casos de crescimento de *Candida albicans* (Sermento et al., 2008) (Figura 11).

Figura 11 - Cultivo de *Candida albicans* em meio de cultura EMB. (A) Jarra de anaerobiose, (B) incubação de *Candida albicans* em ambiente anaeróbico, (C) crescimento de *Candida albicans* em meio EMB (círculo branco)



Fonte: arquivo pessoal

Por fim, foi realizada a prova bioquímica de fermentação de carboidratos, sendo utilizados glicose, maltose, sacarose e lactose. Foram utilizados oito tubos de ensaio, os quais foram divididos em pares. Cada par continha um tipo de açúcar. Em todos os tubos foi inoculada a *Candida* sp., sendo que em um tubo de cada par foi colocado óleo mineral e no outro não. A incubação foi feita em estufa bacteriológica a 37°C por um período de quatro dias. Foi observado que a levedura fermentou a sacarose, glicose e maltose, mas não fermentou lactose (Figura 12), o que, juntamente com a coloração em Chromagar e crescimento em meio EMB, a caracteriza como sendo da espécie *Candida albicans*.

Figura 12 - Prova de assimilação e fermentação de carboidratos. (L – lactose; G – glicose; S – sacarose; M – maltose).



Fonte: arquivo pessoal

O animal foi tratado com o antifúngico Nistatina, solução oral, administrado por meio de seringa, a cada 12 horas, por um período de 14 dias, quando houve a completa remissão dos sintomas.

7 DISCUSSÃO

A *Candida albicans* faz parte da microbiota do trato gastrointestinal das aves, porém, por ser uma levedura comensal e oportunista, seu desequilíbrio populacional pode resultar em alterações clínicas (CUBAS; SILVA; CATÃO-DIAS, 2014).

A *Candida albicans* é o principal agente de candidiose em aves, mas outras espécies, como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. rugosa* também têm sido identificadas como causadoras de infecção em aves (MAIA, 2009). A ingestão de alimentos ou água são os meios habituais para transmissão da doença (FRIEND; FRANSON, 1999), sendo o trato gastrointestinal superior o sistema mais afetado, em particular orofaringe, ingluvío e esôfago.

A candidiose ocorre secundariamente à imunossupressão ou fatores como terapia antimicrobiana que alteram a microbiota residente nas superfícies mucosas, podendo facilitar o crescimento excessivo de leveduras, levando à invasão tecidual (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Também, a infecção pode decorrer da falta de higiene, estresse de transporte e manejo inadequado das aves, afetando, muitas vezes, os psittacíformes, como *Nymphicus hollandicus*, por serem altamente suscetíveis a infecções fúngicas (CUBAS; SILVA; CATÃO-DIAS, 2014; MAIA, 2009).

Em aves adultas, a candidiose caracteriza-se pela formação de placas pseudomembranosas esbranquiçadas na cavidade oral e no trato digestório, placas necróticas ou recobertas por material caseoso que dificultam a deglutição e a respiração (CUBAS; SILVA; CATÃO-DIAS, 2014). A forma cutânea em psitacídeos pode ocorrer na comissura do bico, epiderme nasal, na região da cloaca e em folículos por todo corpo, podendo causar hiperqueratose. Também pode acometer o trato respiratório, porém é raro (CUBAS; GODOY, 2004). Em relação às aves jovens, por possuírem o sistema imune imaturo e a microbiota gastrointestinal ainda estar em formação, a doença ocorre de forma primária (SOUBHIA, 2008).

O animal escolhido para fazer o presente relato de caso era jovem (3 meses) e apresentava a forma cutânea da doença, caracterizada por crosta na comissura do bico, e secreção esbranquiçada limitada somente a cavidade oral, não sendo observada manifestação sistêmica. Pode-se pressupor que a infecção por *Candida albicans* ocorreu de forma primária, pois aves jovens são imuno-incompetentes e mais susceptíveis a doenças. Além disso, o animal não era submetido ao manejo inadequado ou estresse, e se alimentava de forma correta.

De acordo com Cruz (2010) e Miotto et al. (2004) podem ser analisadas amostras obtidas de raspagens de pele e unhas, urina, material purulento, crostas de pele, aspirados,

escarros, secreções brônquicas, sangue, líquido, suabes orais ou cloacais e tecidos. A coleta dessas amostras clínicas pode ser realizada por meio de raspado cutâneo, carpete ou suabe estéril (SANTOS, 2017). O método de coleta e o tipo de amostra escolhidos estão de acordo com o proposto por Santos (2017) e Cruz (2010), pois no caso relatado a amostra foi coletada de crosta da comissura do bico e de secreção em cavidade oral, utilizando-se suabe estéril.

Quanto ao diagnóstico, o material biológico observado está conforme descrito por Murray; Rosenthal e Kobayashi (2000) que afirmaram que a maioria dos procedimentos laboratoriais disponíveis para identificação do fungo *Candida* sp. consistem na observação das suas características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas.

O cultivo em meio de cultura ágar Sabouraud-dextrose acrescido de cloranfenicol corresponde ao recomendado na literatura, por Miotto et al. (2004). De acordo com Cardoso (2013), o meio de cultura deve ser incubado à temperatura de 30 °C durante pelo menos dois dias, o que está de acordo com o procedimento realizado no LAMIV, em que a incubação ocorreu a 28°C por 48 horas.

Conforme descrito por Santos (2017) e Cruz (2010), a colônia pode apresenta-se macroscopicamente de coloração branca a creme, formato circular, aspecto brilhoso ou opaco, textura cremosa ou membranosa, com superfície rugosa, lisa ou sulcada, e odor de levedo, o que está de acordo com o encontrado, pois as colônias apresentavam-se brancas, lisas, com formato circular, brilhosas, de textura cremosa e superfície lisa.

O processamento da amostra para realização de citologia está em concordância com o proposto por Cruz (2010), em que deve-se retirar uma alíquota da colônia com alça de platina, colocando sobre a lâmina e após, adicionar uma gota de corante azul de algodão láctico entre lâmina e lamínula para posterior visualização ao microscópio. Em relação às características morfológicas observadas, elas estão de acordo com Trabulsi e Alterthum (2008), que afirmam que a *Cândida* é um fungo do tipo levedura, unicelular, de forma redonda ou oval, de aproximadamente 5 a 8 µm.

Araújo et al. (2005) relata que diferentes meios cromogênicos de cultivo e a fermentação de compostos específicos, têm sido utilizados para diferenciar *Candida albicans* e outras leveduras de interesse clínico. Assim, para identificação da espécie de *Candida* encontrada no caso, foi feito cultivo em ágar Chromagar, que é um meio diferencial e cromogênico. Após 48 horas de incubação a 37°C, foram observadas colônias de coloração verde, por ação de enzimas espécie-específicas, sendo indicativo da espécie *C. albicans*. A coloração encontrada está de acordo com o que foi descrito por Yucesoy e Marol (2003) e Araújo et al. (2005).

Já o teste de fermentação de carboidratos é utilizado para avaliar a capacidade do micro-organismo usar um composto específico anaerobicamente. O teste envolve a inoculação em vários tubos contendo o inóculo do micro-organismo e um carboidrato a ser avaliado (MIOTTO et al., 2004). Esse teste foi utilizado no caso relatado. A levedura analisada fermentou os açúcares maltose, glicose e sacarose (tardiamente), e não fermentou a lactose. Os resultados encontrados correspondem ao descrito por Cruz (2010) e Mariano (2006) para identificação de *Candida albicans*.

Em um estudo realizado por Sarmento (2008), as leveduras cultivadas em ágar EMB exibem um padrão de cores com tons que podem variar entre o lilás/roxo, rosa e azul. Neste estudo, em relação à cor, as leveduras da espécie *C. albicans* apresentaram 95,34% o tom lilás/roxo. O crescimento da colônia teve aspecto liso em 100% das espécies de *C. albicans* avaliadas. Já a presença de franja foi observada em 100% das espécies de *C. tropicalis*, não sendo essa característica verificada em outras espécies do gênero *Candida*. Os resultados estão de acordo com o encontrado, pois a cultura apresentou coloração lilás, de aspecto liso, sem formação de franjas, sendo indicativo de *Candida albicans*.

É indicado o tratamento com antifúngico nistatina para as aves acometidas de candidose (BRITO, 2009), mas também pode-se utilizar, cetoconazol, fluconazol, itraconazol e anfotericina B, principalmente em casos de candidiose refratária. Esses possuem espectro contra as infecções mais comuns nas aves, causadas por *Aspergillus* spp. e *Candida albicans* (SOUBHIA, 2008). Assim, para o tratamento da calopsita deste presente relato, foi utilizada a nistatina como medicamento de primeira escolha do médico veterinário.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estágio supervisionado é um período que favorece ao estudante a solidificação do aprendizado, tendo contato com o público e com as amostras biológicas que facilitarão o exercício profissional. Durante o estágio foi possível o aprendizado de confecção de meios de cultura, esterilização de materiais, identificação de bactérias e fungos, realização de antibiograma, e recepção de amostras provenientes da clínica de animais silvestres e exóticos.

Entre as amostras recebidas as mais frequentes foram provenientes de aves das espécies *Nymphicus hollandicus*, seguida por *Agapornis* sp. O tipo de amostra mais comum foi transudato e espécie bacteriana mais encontrada foi *Pseudomonas* sp. Em relação aos 15 antimicrobianos testados, aqueles que apresentaram maior resistência foram amoxicilina/ácido clavulânico e ampicilina. Quanto aos fungos, os mais isolados foram das espécies *Candida tropicalis* e *Candida krusei*.

Assim, pode-se afirmar que o diagnóstico microbiológico é um importante auxiliar para os médicos veterinários de animais silvestres e exóticos, pois ainda há poucos dados relatados acerca dos principais agentes etiológicos que acometem esses animais, sobre a forma como eles agem no organismo do animal, e sobre a sensibilidade ou resistência desses agentes aos antimicrobianos. A descrição do relato de caso de *Candida albicans* corrobora com isso, pois a descrição de candidiose ocorrendo de forma cutânea em aves jovens ainda é pouco relada. Além disso, a identificação do micro-organismo auxiliou na escolha de um tratamento eficiente pelos clínicos de animais silvestres e exóticos.

REFERÊNCIAS

- ABDI; ABIHPEC; SEBRAE. **Guia de microbiologia**. 1. ed. 2015.
- ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2002.
- ARAÚJO et al. Identificação das leveduras do gênero *Candida* por métodos manuais convencionais e pelo método cromógeno Chromagar Candida. **Revista de Patologia Tropical**, Goiás, v. 34, n. 1, p.37-42, jun. 2005.
- BAUER, A.W., et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, 45, 493-496, 1996.
- BD DIAGNOSTICS. **Difco & BBL: Manual Manual of Microbiological Culture Media**. 2. ed. Sparks: Ascp, 2009.
- BRACONARO. **Caracterização das microbiotas bacteriana e fúngica presentes em cloacas de passeriformes silvestres confiscados no tráfico que serão submetidos a programas de soltura**. 2012. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- BRASIL, Agência nacional de vigilância sanitária. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**. 1. ed. Brasília: ANVISA, 2004.
- BRASIL, Agência nacional de vigilância sanitária. **Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde: Módulo 5: Tecnologia em Serviços de Saúde: Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos**. 1. ed. Brasília: ANVISA, 2013.
- BRASIL, ministério da saúde. **Manual de Procedimentos Básicos em microbiologia clínica para o Controle de Infecção Hospitalar**. Brasília: ministério da saúde, 2000.
- BRITO, E. H. S. et al. Candidose na medicina veterinária: um enfoque micológico, clínico e terapêutico. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 9, p.2655-2664, dez. 2009.
- BRITO, F.G. **Agar Mueller Hinton** Vila Paris: MBiolog Diagnósticos, 2010.
- BRITO, F.G. **Caldo BHI**. Vila Paris: MBiolog Diagnósticos, 2014.
- BROOKS G.F. et al. **Microbiologia Médica: De Jawetz, Melnick e Adelberg**. 26. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.
- CASAL, M. et al. **Microbiologia e genética molecular microbiana: manual de laboratório**. Copissaurio, 2004.
- CARDOSO, T. S. **Papel do ATP na infecção de Macrófagos por Candida albicans**. 2013. 42 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Bioquímica, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2013.
- CISTIA, C.D. **Microbiologia básica**. 1 ed. Rio de Janeiro: Seses, 2015.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. Medicina veterinária da conservação: Conexão entre saúde humana, saúde animal e saúde do ecossistema. **Revista CFMV**, v.19, n. 59, p.1-88, Brasília, 2013.

COOPER, S. C.; MCLELLAN, G. J.; RYCROFT, A. N. Conjunctival flora observed in 70 healthy domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Veterinary Record**, v. 149, p.232-235, 25 ago. 2001.

CORRÊA, I. M. O. **Enterobactérias e fatores de virulência em cepas de *Escherichia coli* isoladas de psitacídeos**. 2012. 55 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

CRUZ L.C.H. **Micologia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2010.

CUBAS Z.S; SILVA J.C.R; CATÃO-DIAS J.L. **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2014.

CUBAS Z.S; GODOY S.N. **Algumas doenças de aves ornamentais**. 2004.

CUBAS Z.S.; GODOY S.N. Principais doenças bacterianas e fúngicas em psittacíformes: Revisão. **Clínica Veterinária**, v. 14, n. 81, p.88-98, jul. 2009.

DELLARETTI, E. M. **Preservação de fungos em baixas temperaturas**. 2014. 29 f. Monografia (Especialização) - Curso de Biosistemas, Universidade Federal São João Del-Rei, Sete Lagoas, 2014.

FALCONE D.B.; KLINGER A.C.K.; TOLEDO G.S.P. Doenças em coelhos: as 20 enfermidades que mais causam prejuízos na cunicultura: Revisão. **Revista Brasileira de Cunicultura**, Santa Maria, v. 12, n. 1, p.15-36, nov. 2017.

FARIA, C. F. A. **Caracterização do mercado de aquarofilia no Rio Grande do Norte e a aquicultura ornamental de baixo custo de implantação**. 2018. 53 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Desenvolvimento e Meio Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2018.

FARIA P.M.C. et al. Criação, manejo e reprodução do peixe *Betta splendens*. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v. 30, n. 3/4, p.134-149, dez. 2006.

FRAGA C.F. **Ocorrência de doenças micóticas em aves silvestres no Brasil**. 2014. 38 f. TCC (Graduação) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

FRIEND M.; FRANSON J.C. **Field Manual of Wildlife Diseases: general field procedures and diseases of birds**. Washington: Biological Resources Division, 1999.

GERALDES, D. **Censo Pet: 139,3 milhões de animais de estimação no Brasil**. 2019. Disponível em: <<https://www.editorastilo.com.br/censo-pet-1393-milhoes-de-animais-de-estimacao-no-brasil/>>. Acesso em: 20 jul. 2019.

GODOY, S. N.; MATUSHIMA, E. R. **Patologia comparada de psitacídeos mantidos em cativeiro no Estado de São Paulo**. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

HEKER, M. M. Opinião: A cunicultura Pet no Brasil. **Revista Brasileira de Cunicultura**, São Paulo, v. 7, n. 1, p.1-8, abr. 2015.

HOOG, G. S.; GUARRO, J. **Atlas of clinical fungi**. Centraalbureau voor Schimmelcultures, The Netherlands/Universitat Rovira i Virgili, Spain, 1995, 720p.

LABORCLIN. **Manual para antibiograma: difusão em disco** (Kirby & Bauer). Pinhais: Laborclin, 2011.

LAMB et al. Bacteria Isolated From the Skin of Congo African Grey Parrots (*Psittacus erithacus*), Budgerigars (*Melopsittacus undulatus*), and Cockatiels (*Nymphicus hollandicus*). **Journal Of Avian Medicine And Surgery**, Connecticut, v. 28, n. 4, p.275-279, jul. 2014.

LAMI, F. **Fauna parasitária de peixes ornamentais comercializados no estado de Santa Catarina, Brasil**. 2009. 23 f. TCC (Graduação) - Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

LEME, Fabio Caetano Oliveira et al. Evaluation of pathogenic fungi occurrence in traumatogenic structures of freshwater fish. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 2, p.182-185, 1 abr. 2011.

LEVINSON, Warren. **Microbiologia médica e imunologia**. 10. ed. Porto Alegre: Amgh, 2010.

LIMA, S. V. G. **Pesquisa microbiológica em calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) oriundas de pet shops e residências de fortaleza, Ceará**. 2016. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2016.

LOPES, E. S. **Perfil de enterobactérias isoladas de psitacídeos do tráfico de aves silvestres do estado do Ceará**. 2016. 111 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2016.

MACFADDIN J.F. **Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica**. 3. ed. Buenos Aires: Medica Panamericana, 2004.

MACHADO et al. Detecção e avaliação do perfil de sensibilidade antimicrobiana de enterobactérias isoladas de periquitos cara-suja (*Pyrrhura griseipectus*) em cativeiro. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Fortaleza, v. 68, n. 6, p.1732-1736, ago. 2016.

MADIGAN M.T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MAIA, D. C. B. S. C. **Leveduras isoladas do trato gastrintestinal de calopsitas (*Nymphicus hollandicus*): determinação da microbiota e análise fenotípica**. 2009. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2009.

MAKINO, L. C.; NAKAGHI, L. S. O. Pasteurelose em coelhos: relato de casos. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, v. 21, n. 1, p.138-141, dez. 2005.

MARIANO, P. L. S. **Diferentes processos de armazenamento de leveduras; estudos sobre a variabilidade fenotípica e genotípica**. 2006. 117 f. Tese (Doutorado) - Curso de Odontologia, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2006.

MARINHO M. et al. Microbiota fúngica de passeriformes de cativéis da região noroeste do estado de São Paulo. **Vet. e Zootec.**, São Paulo, v. 17, n. 2, p.288-292, jun. 2010.

MIOTTO, N. M. L. et al. Métodos laboratoriais de identificação do fungo *Candida* sp. **Revista da Faculdade de Odontologia**, Passo Fundo, v.9, n. 1, p.27-33, jun. 2004.

MONTEIRO, J. N. **Identificação de bactérias do complexo *Burkholderia cepacia* através de utilização de ferramentas computacionais**. 2017. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Biomédica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.

MUSA N. et al. Surveillance of Bacteria Species in Diseased Freshwater Ornamental Fish from Aquarium Shop. **World Applied Sciences Journal**, Terengganu, v. 3, n. 6, p.903-905, 2008.

MURRAY, P. R; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S. **Microbiologia médica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

OLINDA, R. G. et al. Isolamento de *Alcaligenes faecalis* em peixe *Betta splendens* Regan, 1910 no Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 4, p.360-362, dez. 2014.

OPLUSTIL et al. **Procedimentos básicos em Microbiologia clínica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2010.

PELCZAR Jr. M.J; CHAN E.C.S.; KRIEG N.R. **Microbiologia: Conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Pearson Makron Brooks, 1997.

PREUSS, J.F.; SCHAEGLER, P. F. Diagnóstico da fauna silvestre apreendida e resgatada pela polícia militar ambiental de São Miguel do Oeste, Santa Catarina, Brasil. **Unoesc & Ciência: Acbs**, Joaçaba, v. 2, n. 2, p.141-150, dez. 2011.

QUINN P.J. et al. **Microbiologia Veterinária: E doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2007.

QUINTON J.F. **Novos animais de estimação: pequenos mamíferos**. São Paulo: Roca, 2005.

ROBERTS, H. E.; PALMEIRO, B.; WEBER, E. S. Bacterial and Parasitic Diseases of Pet Fish. **Veterinary Clinics Of North America: Exotic Animal Practice**, v. 12, n. 3, p.609-638, set. 2009.

SANCHES. **Causas de morte em passeriformes: comparação entre aves de vida livre residentes na região metropolitana de São Paulo e aves oriundas do tráfico**. 2008. 185 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SANTILLÁN, R. D. B. **Reprodução do *Betta splendens***. 2007. 11 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Florestal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Saropédica, 2007.

SANTOS, C. L. **Microbiota de psitacíformes silvestres e exóticos mantidos em centros de reabilitação e triagem**. 2017. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

SARMENTO, D. N et al. Avaliação do ágar eosina azul de metileno (EMB) para identificação presumida de leveduras do gênero *Candida*. In: Congresso de Análises Clínicas, 35, 2008, Pará. **Resumo**. Fortaleza: Ascom/iec/svs/ms, 2008. p. 1 - 1.

SBPC/ ML. **Boas práticas em microbiologia clínica**. 1. ed. Barueri: Manole, 2015

SICK H. **Ornitologia brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997.

SILVEIRA, L. F. Calopsita: a pequena Cacatua australiana. **Cães & Cia**, Campinas, v. 34, n. 397, p.62-63, jul. 2012. SOLA, M. C. et al. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. **Enciclopédia Biosfera: Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v. 8, n. 14, p.1398-1418, jun. 2012.

SOUBHIA C.B. et al. Candidíase: Revisão de Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v. 11, n. 6, p.1-5, jul. 2008.

TORTORA G.J.; FUNKE B.R.; CASE C.L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TRABULSI L.R.; ALTERTHUM F.A. **Microbiologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2008.

TRABULSI L.R.; ALTERTHUM F.A. **Microbiologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2004.

VERMELHO A.B. et al. **Práticas de microbiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

WERTHER, K. Semiologia de Animais Silvestres. In: FEITOSA F.L.F. **Semiologia Veterinária: A Arte do Diagnóstico**. São Paulo: Roca, 2004. p. 724-792.

YUCESOIY M.; MAROL S. Performance of CHROMagar *Candida* and BIGGY agar for identification of yeast species. **Ann Clin Microbiol Antimicrob** 2: 1-8, 2003.