

Implementação do método “Detecção e Enumeração de *Pseudomonas aeruginosa* em águas de consumo humano”

Versão final após defesa

Neuza Santos Antunes

Relatório de Estágio para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Mestre Alexandra Sofia Morgado Figueiredo
Co-orientador: Prof. Doutor António José Geraldês de Mendonça

julho de 2024

Declaração de Integridade

Eu, Neuza Santos Antunes, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M12597 de Bioquímica da Faculdade de Ciências, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referenciação de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 30/07/2024

Neuza Santos Antunes

Dedicatória

Dedico a todos aqueles que me acompanharam nesta caminhada, sempre acreditaram em mim e nunca me deixaram desistir, em especial aos meus pais, sem eles não teria sido possível.

“Conhecimento não é aquilo que você sabe, mas o que você faz com aquilo que você sabe.”

Aldous Huxley

Agradecimentos

Agradeço à ALS Life Sciences pela oportunidade de me ter recebido durante estes 9 meses e por me ter permitido realizar o estágio curricular na área que eu gosto. A toda a equipa que me recebeu como se eu fosse um deles e sempre confiaram em mim e me acolheram tão bem.

À minha orientadora Mestre Alexandra Figueiredo por toda a disponibilidade, ajuda, por todas as dúvidas esclarecidas, pela orientação e confiança ao longo do estágio.

Ao meu co-orientador Prof. Doutor António Mendonça por estar sempre disponível, pelo seu apoio, pela sua ajuda e por todas as dúvidas tiradas.

Ao Fábio que sempre me ensinou, confiou em mim, me ajudou nas minhas dificuldades e sempre me encorajou. Ao João que tinha sempre algo novo a ensinar, que tinha sempre um abraço e uma palavra amiga a dizer e sempre acreditou em mim. À Ana que tinha sempre um abraço e uma palavra de incentivo. À Anabela que tinha sempre alguma maneira de me fazer rir, mas ao mesmo tempo tinha sempre um conselho a dar. À Raquel pelos conselhos e por todas as vezes que me desafiou a ser melhor.

À site manager Liliane Gaspar que sempre se preocupou comigo e sempre teve uma palavra de conforto. À Carla que tinha sempre um abraço e uma palavra amiga e de encorajamento para dar.

À minha família que sempre acreditou em mim, mas agradeço em especial aos meus pais, que sempre me apoiaram, me incentivaram e sempre acreditaram que eu seria capaz. Por todo o amor e carinho que me deram e por tudo o que fizeram para eu ser quem sou hoje.

À Anita que mais do que uma prima é uma amiga. Por todas as mensagens e chamadas ao longo deste percurso. Que sempre festejou as minhas conquistas como se fossem dela e nos momentos mais difíceis sempre me acolheu e teve as melhores palavras a dizer que me fizeram sempre acreditar em mim e a nunca desistir.

À Joana, uma amiga da Covilhã para a vida. Por todos os momentos passados, por todos os lanches e jantares e por estar sempre lá para mim. Por me escutar e aconselhar nos momentos menos bons, mas principalmente por festejar comigo os momentos bons e estar sempre presente.

À Bea, que levo comigo para a vida, por todos os lanches, passeios e pelas horas de conversa. Por ter estado presente ao longo destes anos, por todas as brincadeiras, por estar sempre lá para mim e por tornar a Covilhã um lugar de momentos a recordar.

A todos os meus amigos e a todos aqueles que se cruzaram comigo nesta caminhada e que sempre tiveram uma palavra de carinho e de conforto.

Resumo

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria com a capacidade de causar graves problemas a nível de saúde pública devido à sua grande versatilidade genética, à produção de diversos fatores de virulência, à resistência antibiótica e à formação de biofilmes. Contudo, a obrigatoriedade da análise deste microrganismo em águas de consumo humano não está presente em nenhum Decreto-Lei. Como tal, surge a necessidade de implementar métodos que analisem a presença desta espécie nas águas de consumo humano devido aos perigos associados.

No decorrer deste estágio curricular, na ALS Life Sciences, foi implementado e estudado o método “Deteção e enumeração de *Pseudomonas aeruginosa* em águas de consumo humano” segundo a norma ISO 16266:2006 - Qualidade da água - Deteção e enumeração de *Pseudomonas aeruginosa* - método por filtração de membrana. De acordo com a norma ISO 16266:2006 este ensaio é dividido em 3 etapas fundamentais: filtração, enumeração e confirmação. Para tal, foram recolhidas diversas amostras de água de consumo humano de diversos locais e após contaminadas com diversas estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* foram filtradas, enumeradas e confirmadas.

Na implementação do método foram analisados diversos parâmetros, desde o controlo de qualidade do meio de cultura, as características de performance do método, que incluem a sensibilidade, a especificidade, a taxa de falsos positivos, a taxa de falsos negativos, a seletividade, a eficiência, a repetibilidade e a incerteza. Para além disso, foi avaliada também a precisão e a exatidão.

Tendo em consideração os resultados obtidos nos ensaios realizados, verificou-se que o método foi bem implementado, sendo adequado aos fins a que se destina e estando o laboratório de microbiologia de Castelo Branco da ALS Life Sciences apto para efetuar esta análise.

Palavras-chave

Pseudomonas aeruginosa; ISO; saúde; qualidade da água

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is a bacterium with the capacity to cause serious public health problems due to its great genetic versatility, the production of various virulence factors, antibiotic resistance and the formation of biofilms. However, the mandatory analysis of this microorganism in water for human consumption is not included in any Decree-Law. As such, there is a need to implement methods that analyze the presence of this species in water for human consumption due to the associated dangers.

During this curricular internship, at ALS Life Sciences, the method “Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* in water for human consumption” was implemented and studied according to the ISO standard 16266:2006 - Water quality - Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* - method by membrane filtration. According to the ISO standard 16266:2006, this test is divided into 3 fundamental steps: filtration, enumeration and confirmation. To do this, several samples of water for human consumption were collected from different locations and, after being contaminated with different strains of *Pseudomonas aeruginosa*, they were filtered, enumerated and confirmed.

When applying the method, several parameters were analyzed, from quality control of the culture medium, as well as performance characteristics of the method, which include sensitivity, specificity, false positive rate, false negative rate, selectivity, efficiency, repeatability and uncertainty. In addition, precision and accuracy were also evaluated.

Considering the results obtained in the tests carried out, it was verified that the method was well implemented, being suitable for the purposes for which it was intended and the ALS Life Sciences microbiology laboratory in Castelo Branco is able to carry out this analysis.

Keywords

Pseudomonas aeruginosa; ISO; health; water quality

Índice

Capítulo 1 - Introdução.....	1
1.1 - Empresa ALS Life Sciences	1
1.2 - Setores da empresa - Castelo Branco	3
1.3 - Laboratório de microbiologia - Castelo Branco	3
1.4 - Rotina laboratorial	4
1.4.1 - Preparação de meios	4
1.4.2 - Análise de águas	4
1.4.3 - Análise de alimentos.....	7
1.4.4 - Análise de produtos DPH	9
1.4.5 - Repicagens.....	10
1.4.6 - Leituras e confirmações.....	10
1.4.7 - Preparação de culturas de trabalho e de suspensões para teste.....	10
1.5 - Importância do estudo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
Capítulo 2 - Materiais e métodos.....	16
2.1 - Norma ISO 16266:2006 - Qualidade da água - Detecção e enumeração de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - método por filtração de membrana	16
2.1.1 - Princípio	16
2.1.2 - Meio de cultura.....	16
2.1.3 - Meios e reagentes confirmatórios	17
2.1.4 - Aparelhos e material de vidro	17
2.1.5 - Método de filtração por membrana	18
2.1.6 - Incubação	19
2.1.7 - Análise das membranas e enumeração	20
2.1.8 - Confirmação das colónias.....	20
Capítulo 3 - Implementação do método de filtração por membrana para a deteção e enumeração de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
3.1 - Preparação de culturas de trabalho	25

3.2 - Preparação de suspensões para teste	25
3.3 - Contaminação de amostras de água para ensaios	26
3.4 - Filtração por membrana das amostras contaminadas	27
3.5 - Repicagem das estirpes.....	27
3.6 - Confirmação das estirpes.....	29
3.6.1 - Colónias verdes/azuis.....	29
3.6.2 - Colónias castanhas/vermelhas	30
3.6.3 - Colónias fluorescentes sem pigmento (brancas)	33
3.7 - Controlo de qualidade do meio de cultura.....	34
3.7.1 - Esterilidade, produtividade e seletividade	35
3.8 - Verificação das características de performance do método.....	36
3.8.1 – Sensibilidade, especificidade, taxa de falsos positivos, taxa de falsos negativos, seletividade e eficiência	37
3.8.2 - Repetibilidade	38
3.8.3 - Incerteza.....	40
3.8.4 - Precisão	42
3.8.5 - Exatidão	42
Capítulo 4 - Conclusão.....	44
Bibliografia	46
Anexo A - Preparação dos meios e reagentes de confirmação de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	49

Lista de figuras

Figura 1. Logotipo da empresa ALS Life Sciences.	1
Figura 2. Localizações da empresa ALS Life Sciences.	1
Figura 3. Controlo ao meio agar Cetrimida. A - Controlo positivo: <i>Ps. aeruginosa</i> . B - Controlo negativo: <i>E. coli</i>	2
Figura 4. Pesagem de meios.	4
Figura 5. Filtração por membrana.	5
Figura 6. Resumo da metodologia aplicada a amostras de água para a deteção de <i>Legionella</i> spp.	7
Figura 7. Pesagem e diluição de amostras alimentares.	8
Figura 8. Método de incorporação em placa com o meio Rapid EB.	9
Figura 9. Culturas de trabalho em meio líquido.	11
Figura 10. Culturas de trabalho em meio sólido. A - <i>Ps. aeruginosa</i> . B – <i>E. coli</i> . C - <i>Staphylococcus aureus</i>	12
Figura 11. Meios e condições de crescimento das estirpes (Preparação de culturas de trabalho).	12
Figura 12. <i>Ps. aeruginosa</i> , sideróforo verde-amarelo fluorescente.	13
Figura 13. Filtração de 100 mL de ACH através de uma membrana de porosidade 0,45 µm numa rampa de filtração estéril.	18
Figura 14. Método de filtração por membrana.	19
Figura 15. Estufa de incubação a 36±2°C.	19
Figura 16. Tiras PanReac AppliChem Oxidase.	21
Figura 17. Procedimento do teste da oxidase.	22
Figura 18. Meio King B.	22
Figura 19. Tubo de caldo de acetamida.	23
Figura 20. Resumo dos passos a seguir de modo a verificar a presença de <i>Ps. aeruginosa</i>	24

Figura 21. Diluições sucessivas das culturas de trabalho em meio líquido. Exemplo: <i>Ps. aeruginosa</i> .	25
Figura 22. <i>Ps. aeruginosa</i> formadora de colónias verdes/azuis.	28
Figura 23. <i>Ps. aeruginosa</i> formadora de colónias castanhas/vermelhas.	28
Figura 24. <i>Ps. aeruginosa</i> formadora de colónias brancas.	29
Figura 25. Produção de fluorescência pelas colónias castanhas/vermelhas através do teste King B.	30
Figura 26. Controlo positivo e negativo no meio King B. A - Controlo negativo: <i>E. coli</i> . B - Controlo positivo: <i>Ps. aeruginosa</i> .	31
Figura 27. Produção de amónia a partir da acetamida pela <i>Ps. aeruginosa</i> formadora de colónias castanhas/vermelhas.	31
Figura 28. Controlo positivo e negativo no meio caldo de acetamida. A - Controlo positivo: <i>Ps. aeruginosa</i> . B - Controlo negativo: <i>E. coli</i> .	32
Figura 29. Controlo positivo e negativo no meio TSI. A - Controlo positivo: <i>Salmonella</i> spp.. B - Controlo negativo: <i>Ps. aeruginosa</i> .	33
Figura 30. Avaliação de fermentação de açúcares através do meio TSI pela espécie <i>Ps. aeruginosa</i> .	33
Figura 31. Produção de amónia a partir da acetamida pela <i>Ps. aeruginosa</i> formadora de colónias brancas.	34
Figura 32. Produção de fluorescência pela <i>Ps. aeruginosa</i> formadora de colónias brancas através do teste King B.	34
Figura 33. Cálculo da precisão intermediária e do critério de aceitação.	42

Lista de tabelas

Tabela 1. Meios e respetivos microrganismos em estudo nas águas	7
Tabela 2. Meios e respetivos microrganismos em estudo nos alimentos	9
Tabela 3. Constituintes e respetivas quantidades do meio CN.	16
Tabela 4. Constituintes e respetivas quantidades do suplemento do meio CN.	17
Tabela 5. Testes de confirmação a realizar nas colónias que crescem no meio CN.	20
Tabela 6. Contaminação das amostras de água para o cálculo da incerteza.	26
Tabela 7. Contaminação das amostras de água para o cálculo da repetibilidade.	27
Tabela 8. Contaminação das amostras de água para a verificação das caraterísticas de performance do método.	27
Tabela 9. Testes de confirmação obrigatórios e secundários efetuados nas colónias de <i>Ps. aeruginosa</i>	29
Tabela 10. Resultados obtidos na avaliação das caraterísticas de performance do método.	36
Tabela 11. Caraterísticas de performance expressas num diagrama 2x2 segundo a norma ISO 13843:2017 - Qualidade da água - Requisitos para o estabelecimento das caraterísticas de desempenho dos métodos microbiológicos quantitativos.	37
Tabela 12. Cálculo das caraterísticas de performance do método com os resultados obtidos.	38
Tabela 13. Contagem de colónias nas amostras de avaliação da repetibilidade.	38
Tabela 14. Resultados do cálculo da média aritmética, da variância, da variância relativa operacional e do índice de dispersão de Poisson.	39
Tabela 15. Cálculo da incerteza para a quantificação de <i>Pseudomonas</i>	40
Tabela A1. Constituintes e respetivas quantidades do agar nutriente.	49
Tabela A2. Constituintes e respetivas quantidades do reagente oxidase.	49

Tabela A3. Constituintes e respectivas quantidades do meio King B.	50
Tabela A4. Constituintes e respectivas quantidades da Solução B do caldo de acetamida.	50
Tabela A5. Constituintes e respectivas quantidades da Solução A do caldo de acetamida.	50
Tabela A6. Constituintes e respectivas quantidades do reagente de Nessler.	50

Lista de acrónimos

ACH - Águas de consumo humano

Agar Sabouraud - Agar Sabouraud Dextrose

ALOA - Agar Listeria Ottaviani & Agosti

APT - Água peptonada tamponada

APW - Água peptonada alcalina

ATCC - Coleção de Culturas do Tipo Americano

BCA - Agar *Bacillus cereus*

BCYE - Agar extrato de levedura de carvão tamponado

BHI - Caldo de infusão cérebro coração

CCA - Agar Cromogénico Coliformes

CN - Agar Cetrimida

CQ - Controlo de qualidade

DPH - Drogaria, perfumaria e higiene

E. coli - *Escherichia coli*

Gio - Caldo Giolitti-Cantoni

GVPC - Agar Glicina-vancomicina-polimixina-cicloheximida

HF - Caldo Half Fraser

IEC - Comissão Eletrotécnica Internacional

ISO - Organização Internacional de Normalização

Ka - Agar Azida de Esculina Canamicina

MGM - Caldo Glutamato Modificado com Minerais

MRS - Agar Man, Rogosa e Sharpe

MSA - Agar Manitol Sal

N_O - Número de UFC no meio de cultura de referência

N_S - Número de UFC no meio de cultura teste

PCA - Agar de contagem de placa

P_R - Produtividade

Ps. - *Pseudomonas*

Rapid EB - RAPID' *Enterobacteriaceae*

RPF - Agar Baird Parker RPF

SL - Agar Slanetz-Bartley

SPS - Agar Sulfito Polimixina Sulfadiazina

Symphony - Agar Symphony

T7 - Agar Tergitol 7

TBX - Agar Triptona Bile X-Glucoronídeo

TSA - Agar Triptona de Soja

TSC - Agar Triptose Sulfito Cicloserina

TSI - Agar Ferro de Açúcar Triplo

UFC - Unidades formadoras de colônias

UV - Ultravioleta

VRBL - Agar Bile Vermelho Violeta Lactose

WDCM - Centro Mundial de Dados para Microrganismos

WPCA - Agar Extrato de Levedura

Capítulo 1 - Introdução

1.1 - Empresa ALS Life Sciences

A ALS Life Sciences, figura 1, é uma empresa presente em mais de 70 países, figura 2, incluindo Portugal. Esta empresa presta diversos serviços, entre os quais, serviços laboratoriais, consultorias, auditorias, formações, inspeções e desenvolvimento de soluções informáticas à medida de cada cliente. Em Portugal, a ALS tem uma equipa com mais de 200 colaboradores, distribuídos pelos diversos pontos do país, desde Tondela (sede da empresa), Lisboa, Barcarena, São João da Madeira, Madeira, Porto e Castelo Branco, onde realizei o meu estágio curricular.



Figura 1. Logótipo da empresa ALS Life Sciences, (ALS, 2024).



Figura 2. Localizações da empresa ALS Life Sciences, adaptada de (ALS, 2024).

Esta empresa, em Portugal, apresenta diversas divisões: ambiental, que se foca no controlo laboratorial de águas, solos e sedimentos; alimentar, que tem como objetivo serviços de

segurança, autenticidade e qualidade; tribologia; saúde animal, que visa o controlo laboratorial para apoio ao diagnóstico e à profilaxia e, por fim, a certificação.

Na divisão ambiental, na qual se enquadra a implementação do método de filtração por membrana para a deteção e enumeração de *Pseudomonas aeruginosa*, a ALS conta com uma rede de laboratórios analíticos modernos, que estão acreditados pela norma NP EN ISO/IEC (Organização Internacional de Normalização/Comissão Eletrotécnica Internacional) 17025:2018 - Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração. Esta empresa efetua uma ampla gama de análises (físicas, químicas, isotrópicas, orgânicas, microbiológicas, biológicas, radiológicas e toxicológicas). Estas análises podem ser realizadas em diversas matrizes, desde águas de consumo humano (ACH), águas de processo, águas residuais, águas superficiais e subterrâneas, solos, lamas e a resíduos.

A ALS prima pela sua qualidade e resultados analíticos confiáveis e reprodutíveis. O controlo de qualidade (CQ) passa pelo controlo de equipamentos, reagentes e meios de cultura. O CQ inclui a verificação interna dos equipamentos, como a monitorização contínua de temperaturas, a verificação diária das balanças e a calibração dos equipamentos por laboratórios externos. O CQ é também garantido pela execução de brancos e controlos positivos e negativos diários, como presente na figura 3. Nesta figura está representado o controlo diário realizado ao meio agar Cetrimida, através da espécie *Pseudomonas* (*Ps.*) *aeruginosa* como controlo positivo e da espécie *Escherichia coli* (*E. coli*) como controlo negativo. Para além disso, para garantir o rigor dos resultados são realizados CQ internos que avaliam a precisão, através de duplicados e paralelos, e CQ externos que avaliam a exatidão dos resultados, através de ensaios interlaboratoriais.

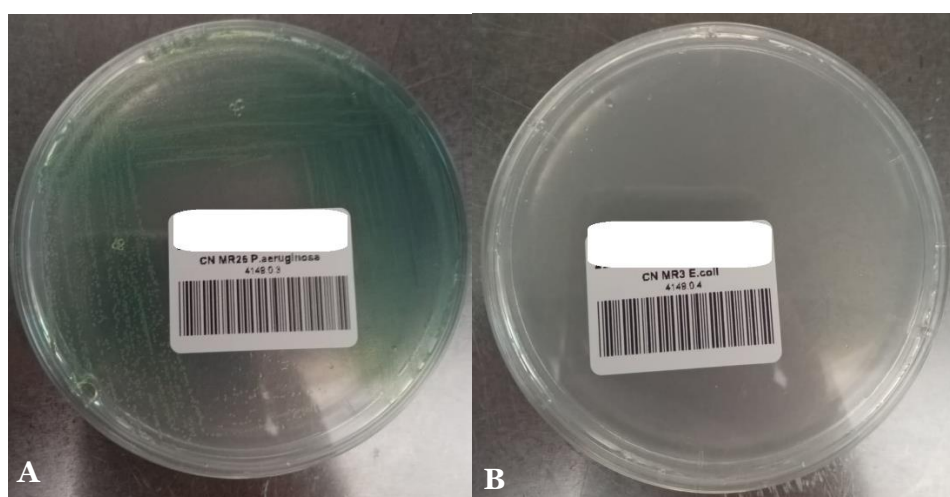


Figura 3. Controlo ao meio agar Cetrimida. A - Controlo positivo: *Ps. aeruginosa*. B - Controlo negativo: *E. coli*.

1.2 - Setores da empresa - Castelo Branco

A ALS está presente em Castelo Branco desde 2020 e conta com diversos setores, desde o laboratório de microbiologia, o laboratório de física e química, a entrada de amostras, a contratação, a logística, o apoio ao cliente, o controlo de pragas, a consultoria, a secção comercial e, por fim, a parte administrativa e financeira.

Os diversos setores da empresa estão muito ligados entre si e a própria empresa permitiu-me a experiência de vivenciar a realidade dos outros setores através de um projeto intitulado “No lugar do outro”, e no qual tive o prazer de participar. Neste projeto, tive a oportunidade de conhecer o setor da logística e aprender o modo e as técnicas de recolha de amostras, bem como todo o processo desde a recolha até à entrada das amostras na empresa.

1.3 - Laboratório de microbiologia - Castelo Branco

O laboratório de microbiologia divide-se em 5 salas distintas:

- Sala dos meios: sala onde os meios de cultura são preparados e se faz a preparação do material e sua esterilização;

- Sala das águas: nesta sala são analisadas as águas, desde a marcação do material, filtração das águas e inoculação das amostras nos respetivos meios;

- Sala dos alimentos: nesta sala são analisadas amostras alimentares e DPH (drogaria, perfumaria e higiene). Nesta sala, a análise é feita desde a etiquetagem do material, pesagem das amostras e respetivas diluições nos meios correspondentes e inoculação das amostras nos meios consoante as análises pretendidas;

- Sala das estufas, repicagens e leituras: nesta sala estão presentes diversas estufas, a diferentes temperaturas, de modo a permitir incubar as placas de Petri ou tubos de ensaio nas condições necessárias para o crescimento dos microrganismos. Para além disto, é onde se processam as repicagens numa câmara de segurança biológica, onde se efetuam as leituras e se realizam as confirmações de colónias suspeitas;

- Sala de lavagens e descontaminação: nesta sala descontaminam-se as amostras e todo o material que esteve em contacto com as mesmas e onde se lava todo o restante material.

Este laboratório para além destas salas está suportado com uma sala onde se armazenam as amostras e que apresenta duas arcas de refrigeração, uma para o armazenamento de amostras que assim necessitem destas condições e outra para o

armazenamento de meios e suplementos. Para além desta sala, existe uma outra onde se armazenam amostras a temperaturas $<-18^{\circ}\text{C}$.

1.4 - Rotina laboratorial

1.4.1 - Preparação de meios

Diariamente são preparados diversos meios consoante as necessidades do laboratório e das amostras a analisar. Na sala de preparação dos meios, os meios são pesados, figura 4, e seguidamente fervidos ou esterilizados na autoclave, segundo as indicações do fornecedor. Na preparação dos meios todas as pesagens são anotadas em ficheiro Excel de forma a estar tudo registado e rastreado. Para além disso, deve registar-se o número dos lotes, a data de produção, o pH do meio, os controlos de qualidade, os suplementos e respetivos lotes (caso os meios necessitem), os ciclos em que os meios são esterilizados e o analista que os preparou. Após a esterilização dos meios, estes podem ser armazenados nas condições apropriadas ou distribuídos (placas de 60 mm ou 90 mm ou tubos) consoante a sua finalidade e, posteriormente, armazenados nas respetivas condições.



Figura 4. Pesagem de meios.

1.4.2 - Análise de águas

Na análise das águas, consoante a análise pretendida, existem duas técnicas de análise: filtração por membrana ou incorporação em placa. Para a quantificação dos microrganismos presentes na amostra a análise é efetuada retirando 1 mL ou 0,1 mL diretamente da amostra e, posteriormente, adicionado o meio. Nas restantes análises efetuadas no laboratório de microbiologia as amostras de água são filtradas através da

filtração por membrana, figura 5, geralmente com uma membrana de porosidade 0,45 µm, sendo o volume filtrado dependente do tipo de amostra. Contudo, na análise dos esporos dos Clostrídios sulfito-redutores a amostra tem de ser submetida a um choque térmico, 77,5°C durante 15 minutos, antes de ser filtrada. Sendo neste caso, a filtração com uma membrana de porosidade 0,20 µm.



Figura 5. Filtração por membrana.

Os meios usados na análise das águas, como, por exemplo, o agar Cromogénico Coliformes (CCA), o agar Slanetz-Bartley (SL), o agar Tergitol 7 (T7), o agar Triptose Sulfito Cicloserina (TSC), o agar Ceftrimida (CN) e o agar Manitol Sal (MSA) são distribuídos para placas de 60 mm. Após a filtração das águas a membrana é colocada sobre estes meios, consoante as análises pretendidas.

Para além dos meios mencionados anteriormente, para os métodos de contagem é também usado o agar Extrato de Levedura (WPCA) que é utilizado pelo método de incorporação em placa. Isto é, após a distribuição da amostra de água na placa, o meio de cultura é adicionado à amostra. No caso das pesquisas, por exemplo da *Salmonella* spp., a membrana após a filtração é colocada num copo ou saco estéril de modo a imergir a membrana no meio APT (água peptonada tamponada).

Os meios utilizados nas análises das águas e as condições em que as placas vão a incubar dependem do microrganismo em estudo e efetua-se segundo as normas e os procedimentos em vigor.

No caso da *Legionella* spp., após a filtração de 1 L da amostra com uma membrana 0,22 µm de porosidade, ou seja, com porosidade menor do que a membrana usada na maioria dos restantes microrganismos, coloca-se a membrana num copo com solução de Ringer. Contudo, se houver águas que não filtram tem de se centrifugar primeiro as amostras. No caso das águas de consumo humano a membrana é imersa em 5 mL da solução, enquanto

nas águas de processo é imersa em 10 mL, devido à maior contaminação destas águas. Posteriormente, a amostra é agitada 2 minutos em vórtex de modo que os microrganismos presentes na membrana passem para a solução e, seguidamente, passa-se à inoculação das amostras de águas em placas com meio.

Nesta análise podem ocorrer duas situações: nas águas de consumo humano inocula-se para placas com meio agar extrato de levedura de carvão tamponado (BCYE) e placas com meio agar Glicina-vancomicina-polimixina-cicloheximida (GVPC), sendo este mais seletivo, e nas águas de processo inocula-se apenas para placas de GVPC, sendo que ambas apresentam a presença de cisteína, que é um aminoácido necessário ao crescimento deste microrganismo. Contudo, em ambas as águas são feitas três tipos de tratamento: sem tratamento; tratamento ácido (adiciona-se 1 mL de amostra a 9 mL de solução ácida em tubos de ensaio e após 5 minutos é realizada a inoculação nos meios) e tratamento térmico (coloca-se 2 mL de amostra em tubos de ensaio durante 30 minutos a 50°C e, posteriormente, faz-se a inoculação). Para além disto, nas águas de consumo humano inocula-se 0,5 mL de amostra e nas águas de processo inocula-se apenas 0,1 mL, uma vez que sendo estas águas mais contaminadas evitamos o crescimento excessivo de interferentes.

Contudo, ainda existem algumas águas residuais que ao terem uma matriz muito contaminada a análise é ligeiramente diferente. Neste caso, com uma ansa de 10 µL a amostra é diretamente semeada numa placa de GVPC pelo método de esgotamento por estrias e, posteriormente, 2 mL da amostra são sujeitos a tratamento térmico e, passados os 30 minutos a 50°C, 1 mL da amostra é submetido ao tratamento ácido e após o tempo deste tratamento é semeado 0,1 mL numa placa de GVPC.

O resumo da metodologia aplicada a amostras de água de consumo humano, de processo e residuais para a deteção de *Legionella* spp. apresenta-se na figura 6.

As placas de BCYE e GVPC são incubadas a 37°C durante 10 dias. Contudo, são feitas leituras ao quinto e ao décimo dia. Caso haja presença de *Legionella* spp. nas águas analisadas verifica-se a presença de colónias ou brancas ou beges ou azuis brilhantes com o aspeto de vidro estilhaçado, quando observadas através da lupa estereoscópica.

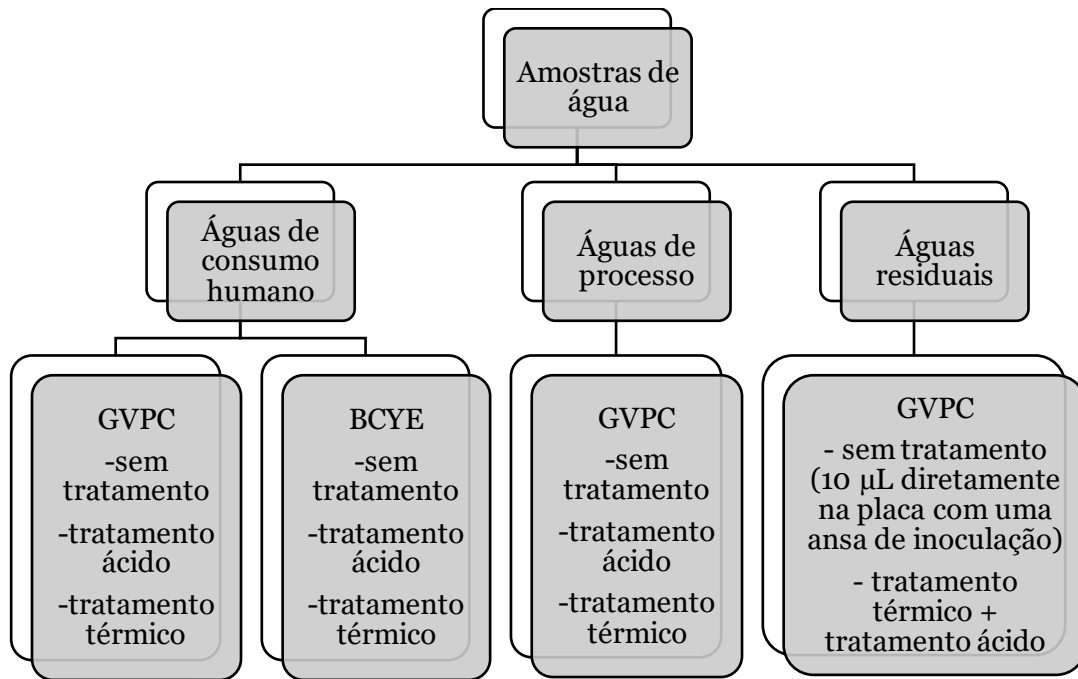


Figura 6. Resumo da metodologia aplicada a amostras de água para a detecção de *Legionella* spp..

Na tabela 1 está um resumo dos meios utilizados nas águas com os respetivos microrganismos em estudo.

Tabela 1. Meios e respetivos microrganismos em estudo nas águas.

Meio de cultura	Microrganismo
CCA	Coliformes + <i>E. coli</i>
SL	Enterococos
T7	Coliformes fecais
TSC	<i>Clostridium perfringens</i>
TSC s/ cicloserina	Esporos dos Clostrídios sulfito-redutores
CN	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
MSA	Estafilococos totais
WPCA	Microrganismos aeróbios a 22°C/37°C
APT	<i>Salmonella</i> spp.
GVPC/BCYE	<i>Legionella</i> spp.

1.4.3 - Análise de alimentos

Na análise dos alimentos as amostras são pesadas e diluídas, figura 7, em APT, caldo Half Fraser (HF), APT suplementado com o indicador de pH púrpura de bromocresol, tampão fosfato ou água peptonada alcalina (APW), consoante a análise pretendida. Sendo o APT, o APT suplementado com o indicador de pH e o tampão fosfato utilizados para a pesquisa de *Salmonella* spp., o HF para a pesquisa de *Listeria* spp. e o APW para a pesquisa de *Vibrio* spp.. Para além disso, consoante a análise pode ser necessário a adição de suplementos.

Após as diluições e a homogeneização da amostra no Stomacher, salvo indicação contrária, as amostras ou são incubadas no tempo e condições adequados ou são feitas diluições e as amostras inoculadas nos meios adequados às análises requisitadas.

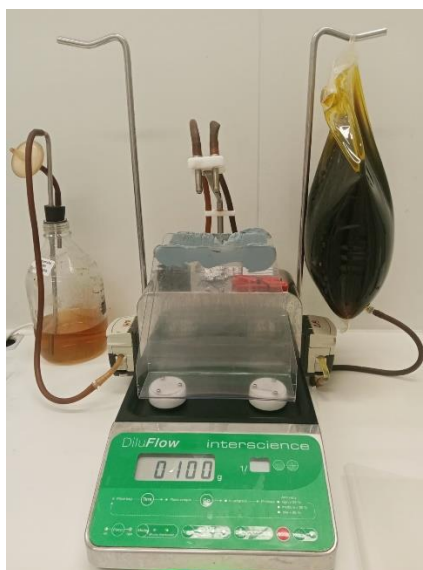


Figura 7. Pesagem e diluição de amostras alimentares.

Os meios usados nas inoculações na análise dos alimentos são diversos, entre os quais, por exemplo, agar de contagem de placa (PCA), agar Triptona Bile X-Glucoronídeo (TBX), agar Symphony (Symphony), agar RAPID'*Enterobacteriaceae* (Rapid EB), agar Man, Rogosa e Sharpe (MRS), CN alimentos, agar Bile Vermelho Violeta Lactose (VRBL), TSC, agar Baird Parker RPF (RPF) e agar Azida de Esculina Canamicina (Ka) que são usados pelo método de incorporação em placas de 90 mm, figura 8. Para além destes, o agar *Listeria* Ottaviani & Agosti (ALOA), o agar *Bacillus cereus* (BCA) e o MSA são distribuídos em placas de 90 mm e a amostra é inoculada posteriormente no meio através do método por espalhamento realizado com uma ansa. Os meios caldo Giolitti-Cantoni (Gio), agar Sulfito Polimixina Sulfadiazina (SPS) e caldo Glutamato Modificado com Minerais (MGM) são distribuídos em tubos e as amostras posteriormente inoculadas no meio líquido.

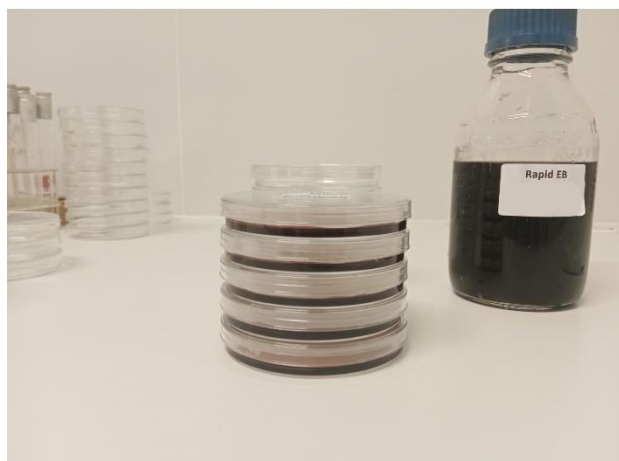


Figura 8. Método de incorporação em placa com o meio Rapid EB.

Na tabela 2 está um resumo dos meios utilizados na análise dos alimentos com os respectivos microrganismos em estudo.

Tabela 2. Meios e respectivos microrganismos em estudo nos alimentos.

Meio de cultura	Microrganismo
APT/APT suplementado com púrpura de bromocresol/tampão fosfato	<i>Salmonella</i> spp.
HF	<i>Listeria</i> spp.
APW	<i>Vibrio</i> spp.
PCA	Microrganismos aeróbios a 30°C
TBX	<i>E. coli</i> β-glucuronidase positiva
Symphony	Bolores e leveduras
Rapid EB	Enterobactérias
MRS	Lactobacilos
VRBL	Bactérias Coliformes a 30°C
RFP	Estafilococos coagulase positiva
Ka	Enterococos
ALOA	<i>Listeria</i> spp.
BCA	<i>Bacillus cereus</i>
MSA	Estafilococos totais
Gio	Estafilococos coagulase positiva
TSC	<i>Clostridium perfringens</i>
SPS	Esporos dos Clostrídios sulfito-redutores
MGM	<i>E. coli</i>

1.4.4 - Análise de produtos DPH

Na análise de produtos DPH as amostras após pesadas são diluídas em caseína e, posteriormente, incubadas nas condições e no tempo indicados.

1.4.5 - Repicagens

Nas repicagens, após a incubação da amostra no diluente específico, a amostra é repicada para meio sólido, consoante a análise pretendida, por exemplo, para RAPID'*Listeria* no caso da pesquisa de *Listeria* spp. e para RAPID'*Salmonella* no caso da pesquisa de *Salmonella* spp.. Posteriormente são colocadas a incubar de acordo com o definido em normas ou procedimentos em vigor para o microrganismo em estudo.

1.4.6 - Leituras e confirmações

Nas leituras, após a incubação, no caso dos métodos quantitativos são escolhidas as placas para contagem de acordo com as normas aplicáveis e caso seja necessário proceder a confirmações são repicadas colónias suspeitas para esta etapa. No caso de métodos de pesquisa as placas são observadas de modo a avaliar o tipo de colónias e proceder à sua confirmação, caso se justifique, isto é, quando há a presença de colónias suspeitas.

Nas confirmações, tanto em métodos quantitativos como em métodos de pesquisa, as colónias são levadas a confirmação de forma a confirmar a presença ou ausência do microrganismo em estudo.

1.4.7 - Preparação de culturas de trabalho e de suspensões para teste

As culturas de trabalho são preparadas a partir de culturas stock, que são culturas em que os microrganismos estão numa suspensão em criotubos com meio crioprotetor, composto por caldo nutritivo e 20% de glicerol, e armazenados a -20°C, com validade de 1 ano. Os criotubos são identificados com a estirpe em causa, a data de produção e a validade.

As culturas de trabalho podem ser preparadas em meio líquido (tubos) ou em meio sólido (placas) consoante a sua utilização. As culturas de trabalho que são preparadas em meio líquido são utilizadas para a quantificação de microrganismos, sendo bastante útil para a contaminação de amostras com quantidade conhecida, enquanto as que são preparadas em meio sólido são para se obter o isolamento de microrganismos e usadas para controlos de qualidade.

Para a preparação de culturas de trabalho em meio líquido, figura 9, retira-se o criotubo da cultura stock da congelação (-20°C) e após descongelado faz-se uma homogeneização da suspensão num vórtex. Posteriormente, com o auxílio de uma ansa transfere-se 10 µL para um tubo contendo o meio necessário ao crescimento da estirpe em causa, seguidamente agita-se em vórtex e, por fim, incuba-se nas respetivas condições. Geralmente, as estirpes são inoculadas no meio caldo de infusão cérebro coração (BHI), a 37°C durante 18 a 24

horas. Contudo, alguns microrganismos, como *Clostridium perfringens* (microrganismo anaeróbio), tem de se inocular em tioglicolato (este meio antes de utilizado tem de ser fervido de modo a libertar o oxigénio), a 37°C durante 18 a 24 horas, mas em anaerobiose (o meio mantém-se anaeróbio se for colocada vaselina por cima do meio, ou então se for colocado numa jarra com um gerador de anaerobiose). Para além deste, ainda existem os bolores e leveduras, como, por exemplo, *Candida albicans*, *Aspergillus* e *Saccharomyces cerevisiae*, que apesar de serem inoculados em BHI, têm de incubar a uma temperatura de 25°C durante 48 a 72 horas. Após o tempo de incubação verifica-se pela turvação o crescimento da estirpe e são armazenadas em refrigeração por um tempo máximo de 8 dias.



Figura 9. Culturas de trabalho em meio líquido.

Simultaneamente, as estirpes são também inoculadas em meio sólido, figura 10. Assim, a partir dos criotubos replica-se 1 μ L com o auxílio de uma ansa para a placa contendo o meio nutritivo correspondente ao crescimento da respetiva estirpe e, para concluir, incuba-se nas respetivas condições. Normalmente, as estirpes são repicadas para agar Triptona de Soja (TSA) e incubam-se a 37°C durante 18 a 24 horas. Contudo, existem microrganismos anaeróbios, tal como, *Clostridium perfringens* que se replica para agar Columbia. Por sua vez, os bolores e leveduras são inoculados em agar Sabouraud Dextrose (agar Sabouraud) e incubados a 25°C durante 48 a 72 horas, para além disto, as placas destes microrganismos não são invertidas durante a incubação. Neste caso de preparação em placa, ainda existe a *Legionella* spp. que tem de ser inoculada em BCYE durante 3 a 5 dias. Após o tempo de incubação verifica-se a pureza da cultura e são armazenadas em refrigeração até 8 dias no máximo.

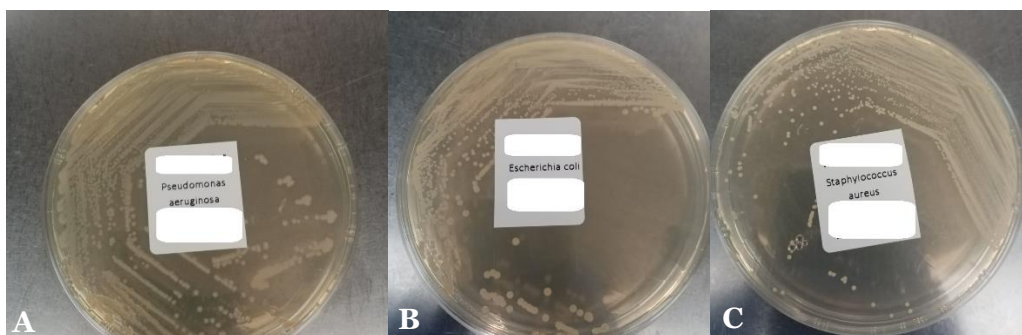


Figura 10. Culturas de trabalho em meio sólido. A - *Ps. aeruginosa*. B - *E. coli*. C - *Staphylococcus aureus*.

Na figura 11 está representado um resumo da preparação das culturas de trabalho.

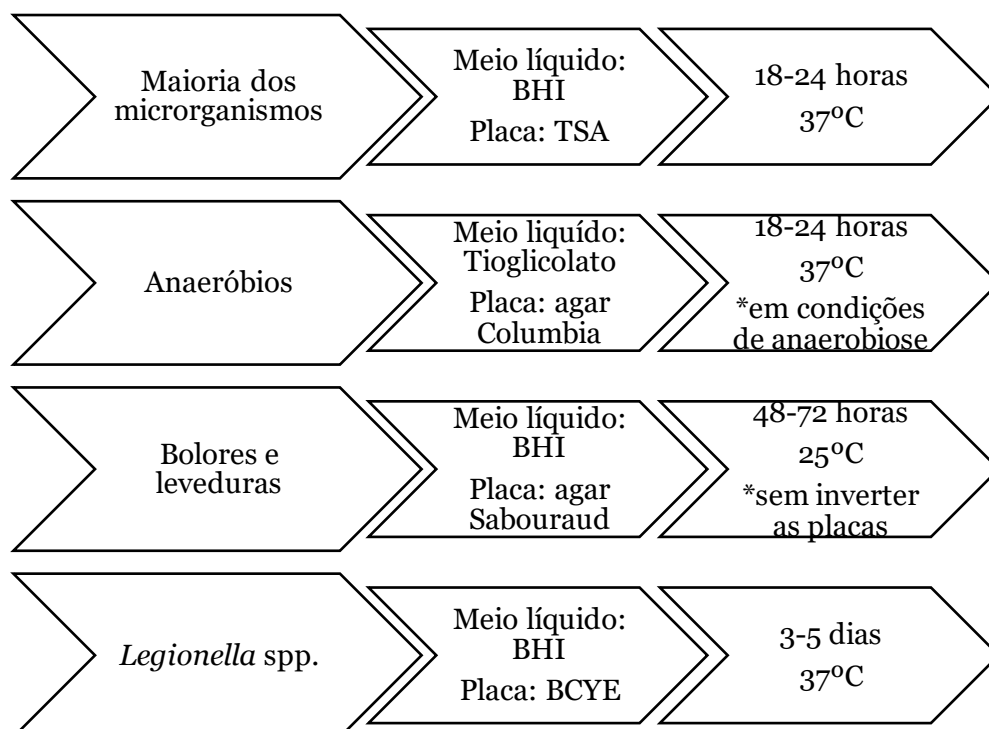


Figura 11. Meios e condições de crescimento das estirpes (Preparação de culturas de trabalho).

As suspensões para teste são feitas a partir das culturas de trabalho em meio líquido e são utilizadas para contaminar amostras com o nível de contaminação pretendido. Para tal, estas culturas têm de ser quantificadas e, para esse propósito, utiliza-se como diluente triptona-sal e são efetuadas diluições seriadas que são inoculadas em meio sólido, consoante o meio necessário ao seu crescimento, TSA, agar Columbia, agar Sabouraud ou BCYE. Após a incubação das placas, no tempo e temperatura adequados, as colónias nas placas são contadas e são efetuados os cálculos de modo a ser conhecida a concentração inicial. Uma vez conhecida as concentrações, em unidades formadoras de colónias (UFC) por mL, das culturas de trabalho são realizados os cálculos de modo a determinar a quantidade de inóculo necessária para contaminar as amostras.

O inóculo pode ser usado, se mantido em temperatura ambiente, até 2 horas, ou então se for conservado em refrigeração $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ até 24 horas.

1.5 - Importância do estudo de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria do gênero *Pseudomonas* e pertencente à família *Pseudomonadaceae* (El-Fouly et al. 2015). As bactérias desta espécie são bacilos Gram-negativos, móveis e que medem cerca de 1–5 µm de comprimento e 0,5–1,0 µm de largura (Diggle et al. 2020). Os bacilos são retos ou ligeiramente curvos e a sua mobilidade deve-se a um ou mais flagelos polares (Willey et al. 2014). Para além disso, podem aparecer como bactérias isoladas, em pares, e ocasionalmente, em cadeias curtas e produzindo por vezes, um odor adocicado ou um cheiro semelhante ao da uva ou do milho (Brooks et al. 2013).

Esta bactéria é um aeróbio estrito cujo intervalo de temperatura ideal de crescimento é entre os 37°C e os 42°C, sendo o seu crescimento a 42°C um fator diferenciador das *Pseudomonas fluorescens* (Brooks et al. 2013). Além disso é oxidase positiva, uma vez que tem a presença da enzima respiratória citocromo C e cuja ausência nas Enterobactérias se torna um fator diferenciador (Brooks et al. 2013). Uma característica importante desta espécie é a produção de pigmentos hidrossolúveis, são eles a pioverdina (sideróforo verde-amarelo fluorescente, figura 12), a piocianina (pigmento azul), a piorrubina (pigmento castanho-avermelhado) e a piomelanina (pigmento castanho/preto) (Hossain 2014). Para além disto, esta bactéria é uma bactéria não fermentadora, sendo incapaz de utilizar os hidratos de carbono como fonte de energia através da sua fermentação, tendo de os degradar pela via oxidativa, e não é produtora de esporos (Deliberali et al. 2011).

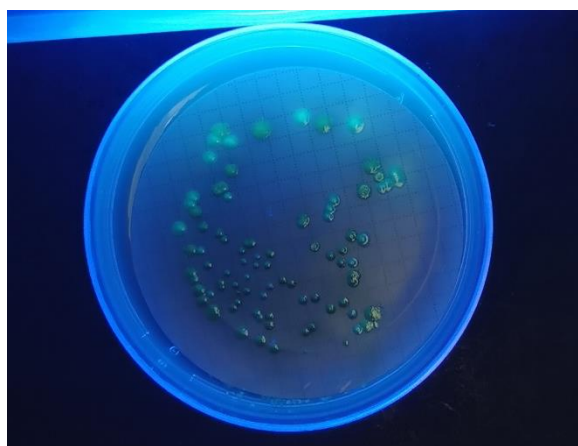


Figura 12. *Ps. aeruginosa*, sideróforo verde-amarelo fluorescente.

O genoma deste microrganismo é relativamente grande, comparativamente a outras bactérias, com 5,5 a 7 milhões de pares de bases (Sathe et al. 2023). Esta espécie possui uma grande versatilidade genética que lhe permite crescer em vários ambientes diferentes, produzir uma variedade de fatores de virulência e apresentar resistência antibiótica à maioria dos antibióticos disponíveis atualmente (Sathe et al. 2023). Devido à sua resistência natural aos antibióticos e à capacidade de formar biofilmes, este patógeno pode causar graves problemas de saúde (Mielko et al. 2019).

Pseudomonas aeruginosa é um microrganismo ubíquo na natureza que pode ser isolado de diversas fontes, incluindo amostras ambientais, animais, alimentares ou humanas (Horna et al. 2021). Está comumente presente em locais húmidos e com poucos nutrientes, podendo colonizar águas hospitalares e domésticas (Garvey et al. 2018). Também pode estar presente em diversas superfícies, tais como em torneiras, lavatórios, sanitas e chuveiros (Garvey et al. 2018). Nos hospitais pode desenvolver-se em humidificadores, nebulizadores e respiradores artificiais e persistir em circuitos de água ou mesmo em certos anti-sépticos, gotas para os olhos, pomadas, sabonetes ou pensos (Morand et al. 2017).

Este microrganismo é um patógeno oportunista que causa doenças em pacientes imunocomprometidos e/ou hospitalizados e nos quais pode causar infecções variadas, como, por exemplo, infecções no trato urinário, na corrente sanguínea, pneumonia, endocardite infecciosa, osteomielite e infecções secundárias de feridas associadas a queimaduras (Opperman et al. 2022). Ou seja, infeta pacientes desprovidos de defesas normais, como, por exemplo, quando as mucosas e a pele são rompidas por lesão tecidual direta, ou pela introdução de cateteres intravenosos ou urinários (Brooks et al. 2013). Para além disso, pacientes que receberam tratamento prolongado com agentes imunossupressores, corticosteroides, antibióticos e radiação também são mais suscetíveis (Madigan et al. 2012).

A formação de biofilmes por este patógeno leva à supressão de respostas imunológicas do hospedeiro (Willey et al. 2014). Uma vez que, há impedimento da penetração de antibióticos e anticorpos e faz com que os fagócitos regulem negativamente os mecanismos de morte (Willey et al. 2014). A formação do biofilme é desencadeada pela produção de monofosfato de guanosina dimérico cíclico e, no caso desta estirpe, também pela produção de homoserina lactona acilada, que são moléculas de comunicação intercelular (Madigan et al. 2012). Devido à capacidade de formação de biofilmes, *Pseudomonas aeruginosa* contribui fortemente para o aparecimento de infecções crónicas, por exemplo, em pacientes com fibrose cística (Horna et al. 2021).

Segundo a Portaria 1220/2000 presente no Diário da República nº299/2000 de 29 de dezembro de 2000 as águas minerais naturais, as águas de nascente e as águas termais são consideradas bacteriologicamente próprias se se apresentarem isentas de *Ps. aeruginosa* em 250 mL da amostra analisada. Relativamente a ACH, o recente publicado Decreto-Lei nº69/2023 publicado no Diário da República de 21 de agosto de 2023 apresenta que os valores paramétricos para *E. coli* e Enterococos deve ser a ausência de qualquer um dos microrganismos em 100 mL de amostra analisada, mas não existem valores de referência em relação à espécie *Ps. aeruginosa*. Mesmo não existindo a obrigatoriedade desta análise, mas tendo em conta os perigos associados a esta espécie surge a importância de implementar métodos que analisem a presença de *Ps. aeruginosa* em ACH, de modo a evitar

o consumo de águas contaminadas com este microrganismo e a comprometer a saúde pública. Deste modo, este trabalho tem como objetivo a implementação da norma ISO 16266:2006 - Qualidade da água - Detecção e enumeração de *Pseudomonas aeruginosa* - método por filtração de membrana, em ACH, garantindo o rigor dos resultados.

Capítulo 2 - Materiais e métodos

2.1 - Norma ISO 16266:2006 - Qualidade da água - Detecção e enumeração de *Pseudomonas aeruginosa* - método por filtração de membrana

2.1.1 - Princípio

Ps. aeruginosa é um microrganismo que cresce em meio seletivo contendo cetrimida e para a detecção e confirmação desta bactéria existem três etapas fundamentais: filtração, enumeração e confirmação. Resumidamente, na filtração um determinado volume da amostra de água, ou uma diluição da amostra, é filtrado através de um filtro de membrana de éster de celulose de 0,45 µm de porosidade e o mesmo é colocado no meio seletivo, com a face quadriculada para cima, e incubado nas condições especificadas para o meio. Na enumeração, após a incubação, as colónias fluorescentes e produtoras de piocianina são consideradas *Ps. aeruginosa* sem a necessidade de confirmação. Por sua vez, as colónias fluorescentes, mas sem a presença do pigmento verde/azul, e as castanhas-vermelhas requerem confirmação. Na confirmação, as colónias fluorescentes, mas sem pigmento, são testadas quanto à capacidade de produzir amónia a partir da acetamida, enquanto as castanhas-vermelhas são testadas para a presença da enzima oxidase e, posteriormente, as colónias positivas ao teste da oxidase são testadas quanto à produção de fluorescência e à capacidade de produzir amónia a partir da acetamida. (ISO 16266:2006, 2006).

2.1.2 - Meio de cultura

O meio de cultura usado para a determinação das *Ps. aeruginosa* é o agar Cetrimida, mais conhecido por CN. Este meio de cultura é composto por peptona de gelatina, hidrolisado de caseína, K₂SO₄, MgCl₂ e agar, cujas quantidades se encontram na tabela 3, e às quais se adiciona 10 mL de glicerol e 1 L de água destilada. (ISO 16266:2006, 2006).

Tabela 3. Constituintes e respetivas quantidades do meio CN.

Constituintes	Quantidade (g)
Peptona de gelatina	16,0
Hidrolisado de caseína	10,0
K ₂ SO ₄	10,0
MgCl ₂	1,4
Agar	11,0

O meio CN após preparado é esterilizado por autoclavagem a 121 ± 3°C durante 15 minutos. Após arrefecer até aos 45-50°C adiciona-se o suplemento. Este suplemento é constituído

por cetrimida e ácido nalidíxico, cujas quantidades se apresentam na tabela 4, e que tem de ser reidratado em 2 mL de água destilada estéril, posteriormente distribui-se para placas de Petri de 60 mm. O pH final do meio solidificado deverá corresponder a $7,1\pm 0,2$ a 25°C e as placas devem ser armazenadas no escuro, protegidas da dessecação a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ e com a validade de 1 mês. Contudo, este meio é adquirido já preparado. (ISO 16266:2006, 2006).

Tabela 4. Constituintes e respectivas quantidades do suplemento do meio CN.

Constituintes	Quantidade (g)
Cetrimida	0,2
Ácido nalidíxico	0,015

Para além disto, e conforme descrito na ficha técnica deste meio, o CN é um meio de cultura seletivo e diferencial para isolamento e identificação de *Ps. aeruginosa*, uma vez que apresenta a peptona de gelatina e o hidrolisado de caseína que são os substratos nutricionais necessários para o crescimento das *Ps.*, o K_2SO_4 e o MgCl_2 que estimulam a produção de piocianina (pigmento azul, não fluorescente, solúvel em água e em clorofórmio), a cetrimida que atua como um agente seletivo inibindo uma grande variedade de espécies bacterianas incluindo várias espécies de *Ps.*, exceto *Pseudomonas aeruginosa*, e o ácido nalidíxico que atua inibindo outros géneros, como *Klebsiella*, *Proteus* e *Providencia* spp.. O agar é o agente solidificante do meio de cultura.

2.1.3 - Meios e reagentes confirmatórios

Os meios e reagentes confirmatórios para *Ps. aeruginosa* são usados quando estão presentes colónias suspeitas de *Ps. aeruginosa* no meio e que necessitam confirmação.

Os meios e reagentes usados são o agar nutriente (podendo ser usados outros meios alternativos, desde que não sejam seletivos e não contenham glícidos fermentáveis), o reagente oxidase, o King B, o caldo de acetamida e o reagente de Nessler. A constituição e respetivas quantidades de cada componente de cada meio e reagente, bem como o modo de preparação encontram-se no **Anexo A**. Contudo, são meios e reagentes obtidos já preparados. (ISO 16266:2006, 2006).

2.1.4 - Aparelhos e material de vidro

O material usado é o habitual de um laboratório de microbiologia. Contudo, tem de se ter especial atenção ao material de vidro, à estufa, à lâmpada de ultravioleta (UV) e às membranas de filtração. (ISO 16266:2006, 2006).

- > O material de vidro é esterilizado a $121\pm 3^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos na autoclave.
- > A estufa é regulada a uma temperatura de $36\pm 2^{\circ}\text{C}$.
- > A lâmpada ultravioleta com comprimento de onda a $360\pm 20\text{ nm}$.
- > As membranas de filtração de éster de celulose são estéreis e com um poro de $0,45\text{ }\mu\text{m}$.

2.1.5 - Método de filtração por membrana

No método de filtração de membrana são filtrados 100 mL da amostra de ACH através de uma membrana de porosidade $0,45\text{ }\mu\text{m}$ numa rampa de filtração estéril, figura 13. Posteriormente, a membrana é colocada no meio CN, conforme esquematizado na figura 14. (ISO 16266:2006, 2006).



Figura 13. Filtração de 100 mL de ACH através de uma membrana de porosidade $0,45\text{ }\mu\text{m}$ numa rampa de filtração estéril.

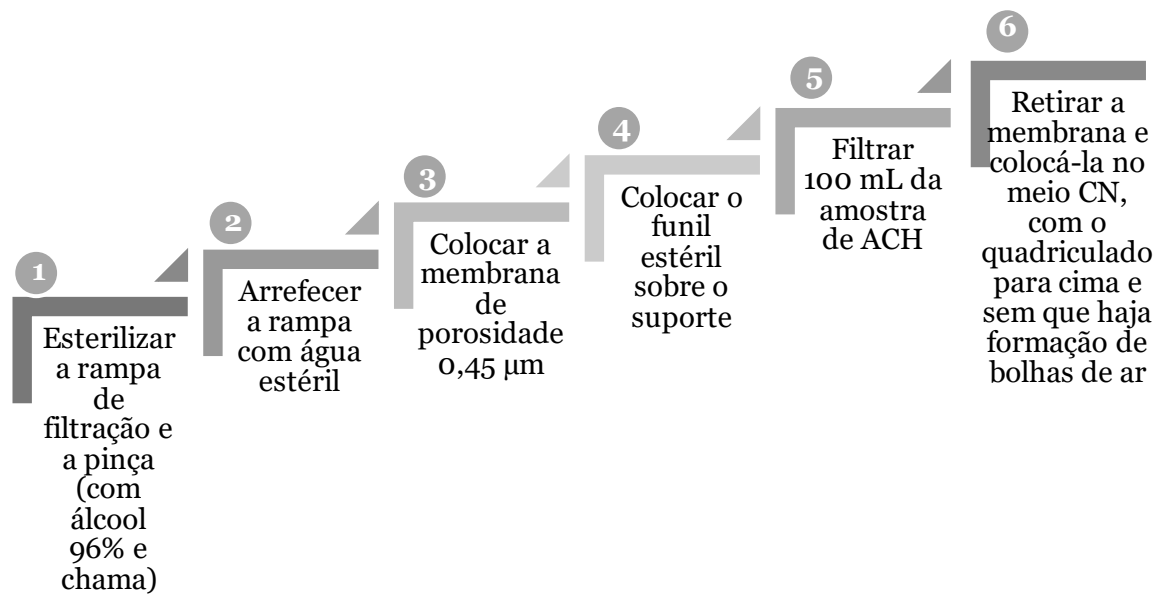


Figura 14. Método de filtração por membrana.

2.1.6 - Incubação

Após o processo de filtração, que permite que os microrganismos com diâmetro superior aos poros da membrana fiquem retidos na mesma, segue-se a incubação. No caso da *Ps. aeruginosa* a temperatura de incubação é $36\pm 2^{\circ}\text{C}$, figura 15, e são feitas leituras às 22 ± 2 horas e às 44 ± 4 horas. (ISO 16266:2006, 2006).



Figura 15. Estufa de incubação a $36\pm 2^{\circ}\text{C}$.

2.1.7 - Análise das membranas e enumeração

Terminado o processo de incubação, passa-se finalmente à observação das membranas. Na observação das membranas podem ser observadas os seguintes tipos de colónias características de *Ps. aeruginosa* (ISO 16266:2006, 2006):

- > Colónias que produzem cor verde/azul (piocianina) e são fluorescentes; todas são contadas como *Ps. aeruginosa* e não necessitam de confirmação;
- > Colónias que não produzem piocianina, ou seja, não apresentam cor verde/azul, mas quando expostas à radiação ultravioleta apresentam fluorescência são confirmadas pela produção de amónia;
- > Colónias que apresentam cor castanha/vermelha e não apresentam fluorescência são confirmadas através do teste da oxidase, pela produção de amónia e pela produção de fluorescência no meio King B.

Na tabela 5 pode analisar-se os testes de confirmação que se realizam nas colónias que crescem no meio CN de forma resumida.

Tabela 5. Testes de confirmação a realizar nas colónias que crescem no meio CN.

	Verde/azul e fluorescente	Fluorescente, mas sem cor verde/azul	Castanha/vermelha	Outro tipo
Produção de amónia	Não testado	✓	✓	Não testado
Deteção de oxidase	Não testado	Não testado	✓	Não testado
Fluorescência no meio King B	Não testado	Não testado	✓	Não testado
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> confirmadas	Sim	Sim	Sim	Não

Em que ✓ significa os testes de confirmações necessários realizar de modo a confirmar a presença de *Ps. aeruginosa*.

2.1.8 - Confirmação das colónias

Após a análise das membranas, algumas vezes é necessário recorrer à confirmação das colónias, e nesse caso usam-se os meios e reagentes mencionados anteriormente e que são explicados de forma mais detalhada a seguir (ISO 16266:2006, 2006):

- > Agar nutriente
 - Meio usado para inocular todas ou o maior número possível de colónias que requerem confirmação, ou seja, um meio usado para aumentar o

crescimento de colónias suspeitas a fim de se conseguirem isolar e, posteriormente, confirmar. Contudo, e como mencionado anteriormente, podem ser usados outros meios alternativos, desde que não sejam seletivos, tal como o TSA, que foi o meio utilizado na implementação do método e o qual foi adquirido da Biokar Diagnostics (Beauvais, França).

> Teste da oxidase

- Existem vários testes de oxidase disponíveis comercialmente e que podem ser utilizados desde que se sigam as instruções do fabricante. Por exemplo, as tiras de oxidase da PanReac AppliChem (Barcelona, Espanha) para a deteção de *Ps. aeruginosa*, figura 16.
 - O procedimento é fácil e rápido e segue os seguintes passos (no caso deste fabricante): 1) Pegar a tira e esperar até atingir a temperatura ambiente; 2) Selecionar uma colónia bem desenvolvida na cultura e retirar uma amostra com uma ansa de inoculação; 3) Com a ansa de inoculação espalhar a colónia pela área de teste e por fim em 4) avaliar o resultado imediatamente e se nos primeiros 60 segundos a área de teste ficar azul então o teste da oxidase é positivo. (PanReac AppliChem, (s.d.)). Este teste tem como base a presença de um corante incolor como o N, N-dimetil-p-fenilenodiamina que ao ser oxidado na presença da enzima oxidase forma o azul de indofenol, que é um composto colorido. Este procedimento está apresentado na figura 17. Contudo, as tiras de oxidase utilizadas neste estudo foram adquiridas da Liofilchem (Roseto degli Abruzzi, Itália), mas que seguem o processo de modo idêntico.



Figura 16. Tiras PanReac AppliChem Oxidase, adaptada de (PVL, (s.d.)).

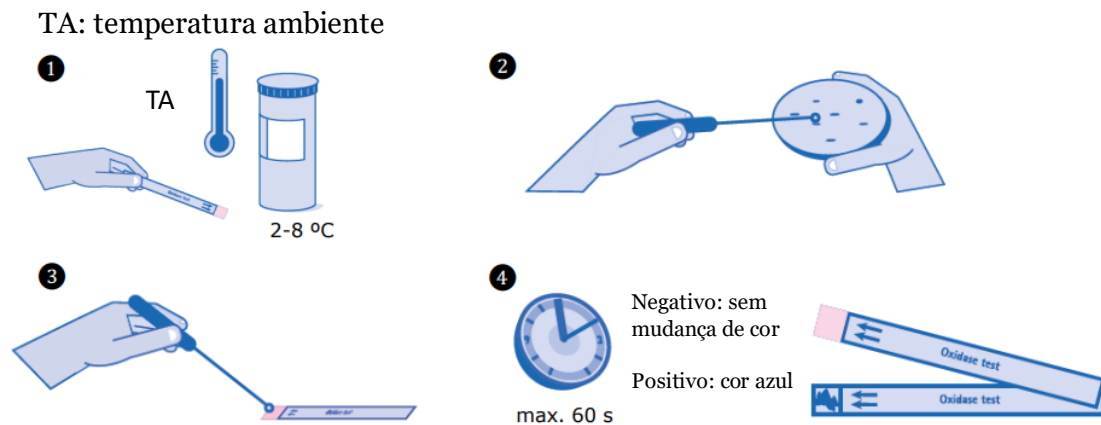


Figura 17. Procedimento do teste da oxidase, adaptada de (PanReac AppliChem, (s.d.)).

> Meio King B

- Inoculam-se as colónias a confirmar a partir da sementeira em TSA (Biokar Diagnostics, Beauvais, França) em meio King B, figura 18, obtido da Biokar Diagnostics (Beauvais, França) e incubam-se a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas até 5 dias. Durante este tempo examina-se diariamente a presença de fluorescência, caso seja verificada fluorescência regista-se como positiva e passa-se à última confirmação.
 - Este meio tem como princípio a deteção da síntese de pioverdina, um pigmento produzido pela bactéria em causa. A presença de sulfato de magnésio proporciona os catiões para a ativação da pioverdina, o que leva a uma alteração da cor do meio de cultura que se torna amarelo-esverdeado fluorescente e apresenta fluorescência quando exposto a radiação UV (Solabia Group, 2022).



Figura 18. Meio King B, (Solabia Group, 2022).

> Caldo de acetamida

- Inoculam-se as colónias a confirmar a partir da sementeira em TSA (Biokar Diagnostics, Beauvais, França) num tubo de caldo de acetamida, figura 19, adquirido da Biokar Diagnostics (Beauvais, França), e incubam-se a $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 22 ± 2 horas. Após a incubação, adiciona-se 1 a 2 gotas do reagente de Nessler, adquirido da PanReac AppliChem (Barcelona, Espanha) e examinam-se os tubos. Caso haja produção de amónia a partir da acetamida há uma variação de cor de amarelo para vermelho-tijolo e confirma-se a presença de *Ps. aeruginosa*.



Figura 19. Tubo de caldo de acetamida, (Solabia Group, 2022).

Na figura 20 está representado um esquema resumo dos passos a seguir de modo a confirmar a presença desta espécie nas amostras de água.

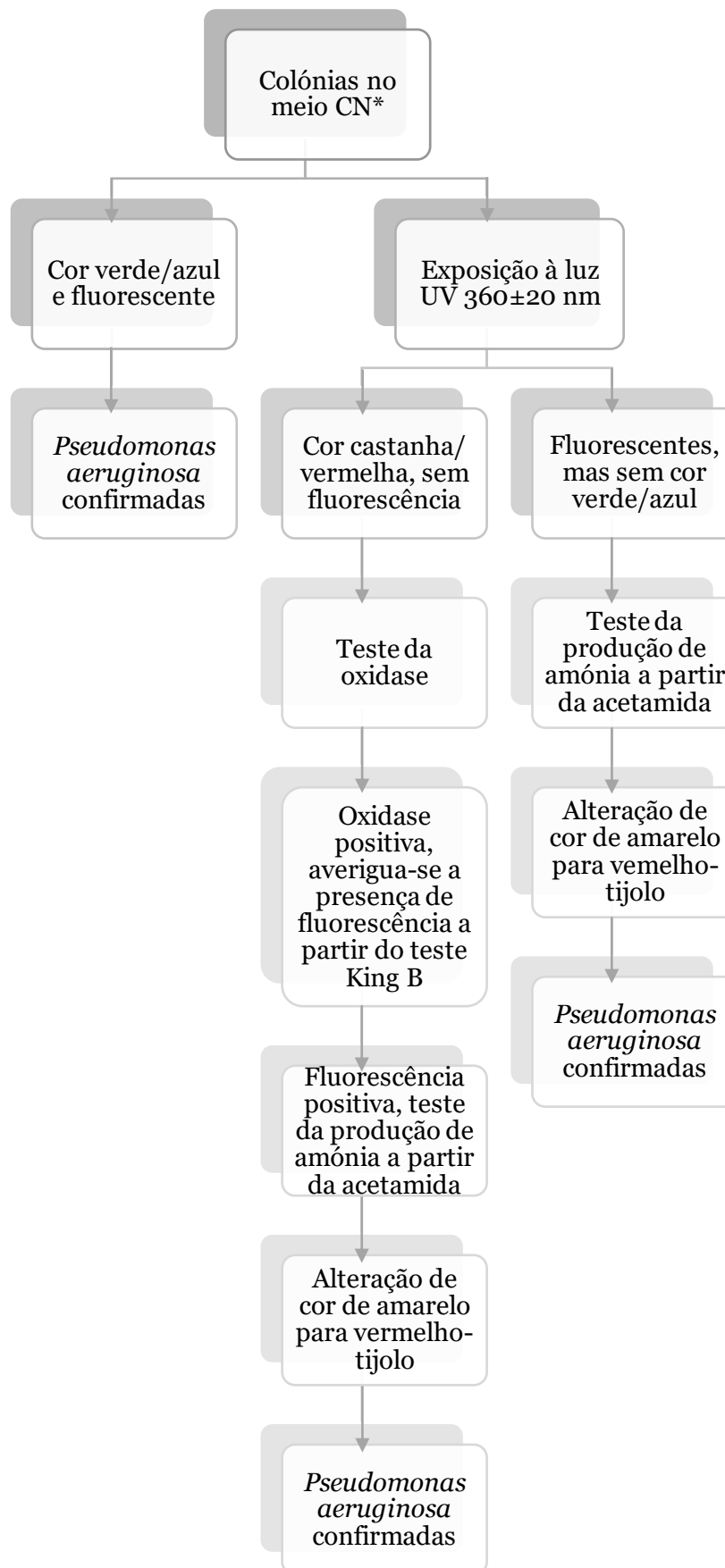


Figura 20. Resumo dos passos a seguir de modo a verificar a presença de *Ps. aeruginosa*.
 *Colônias a $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ e visualizadas às 22 ± 2 horas e às 44 ± 4 horas.

Capítulo 3 - Implementação do método de filtração por membrana para a detecção e enumeração de *Pseudomonas aeruginosa*

3.1 - Preparação de culturas de trabalho

Para a implementação deste método os microrganismos usados foram *Ps. aeruginosa*, *Ps. putida*, *Ps. aeruginosa* formadora de colônias brancas (fluorescentes e sem pigmento verde/azul) e *Ps. aeruginosa* formadora de colônias castanhas/vermelhas. As preparações das culturas de trabalho foram efetuadas como descrito em 1.4.7.

3.2 - Preparação de suspensões para teste

Para a preparação de suspensões para teste, após o tempo de incubação das culturas de trabalho em meio líquido foram realizadas sucessivas diluições, figura 21, e, posteriormente, realizadas sementeiras em placas com o meio TSA (Biokar Diagnostics, Beauvais, França), de modo a determinar a sua concentração, tal como descrito em 1.4.7. A partir da concentração obtida, foram efetuados os cálculos para determinar o volume adequado para a contaminação das ACH.



Figura 21. Diluições sucessivas das culturas de trabalho em meio líquido. Exemplo: *Ps. aeruginosa*.

3.3 - Contaminação de amostras de água para ensaios

As amostras de água foram recolhidas de diferentes lugares do laboratório e, posteriormente, contaminadas com diferentes tipos de *Pseudomonas*, como representado na tabela 6.

Os microrganismos usados nas contaminações foram:

- *Ps. aeruginosa* WDCM (Centro Mundial de Dados para Microrganismos) 00024 (colónias verdes/azuis);
- *Ps. aeruginosa* WDCM 00025 (colónias verdes/azuis);
- *Ps. aeruginosa* colónias castanhas/vermelhas (estirpe selvagem, identificada por MALDI-TOF, D/1825/24);
- *Ps. aeruginosa* colónias brancas (estirpe selvagem, identificada por MALDI-TOF, D/1826/24);
- *Ps. putida* ATCC (Coleção de Culturas do Tipo Americano) 49128;
- *Enterococcus faecalis* WDCM 00087;
- *Staphylococcus aureus* WDCM 00034;
- *Bacillus subtilis* WDCM 00003;
- *E. coli* WDCM 00012.

Tabela 6. Contaminação das amostras de água para o cálculo da incerteza.

	Lote A	Lote B	Conteúdo da amostra
Amostra 1	Analista 1	Analista 3	<i>Ps. aeruginosa</i> WDCM 00024 + <i>Ps. putida</i> WDCM 49128
Amostra 2	Analista 2	Analista 1	<i>Ps. aeruginosa</i> colónias castanhas
Amostra 3	Analista 3	Analista 5	<i>Ps. aeruginosa</i> colónias brancas
Amostra 4	Analista 4	Analista 6	<i>Ps. aeruginosa</i> colónias castanhas + <i>Ps. putida</i> ATCC 49128
Amostra 5	Analista 5	Analista 4	<i>Ps. aeruginosa</i> WDCM 00024
Amostra 6	Analista 6	Analista 2	<i>Ps. aeruginosa</i> colónias brancas + <i>Ps. putida</i> ATCC 49128
Amostra 7	Analista 2	Analista 3	<i>Ps. aeruginosa</i> colónias castanhas + <i>Ps. putida</i> ATCC 49128
Amostra 8	Analista 1	Analista 4	<i>Ps. aeruginosa</i> colónias brancas
Amostra 9	Analista 3	Analista 5	<i>Ps. aeruginosa</i> WDCM 00024 + <i>Ps. putida</i> ATCC 49128
Amostra 10	Analista 4	Analista 6	<i>Ps. aeruginosa</i> WDCM 00024
Amostra 11	Analista 5	Analista 5	<i>Ps. aeruginosa</i> colónias brancas + <i>Ps. putida</i> ATCC 49128
Amostra 12	Analista 4	Analista 3	<i>Ps. aeruginosa</i> colónias castanhas

Nos ensaios realizados para o cálculo da incerteza variaram-se o maior número de parâmetros possíveis: o analista (6 analistas diferentes), o início do ensaio (ensaios realizados a diferentes horas do dia) e o lote (usados 2 lotes diferentes do meio CN: A e B), de modo a englobar todas as variáveis possíveis.

Todos os analistas que participaram nos ensaios são colaboradores qualificados e com uma vasta experiência na realização das diversas etapas, o que é um fator importante na implementação do método.

Para além das 12 amostras mencionadas foram contaminadas mais 3 amostras para estudar a repetibilidade, tabela 7, e mais 5 para estudar a performance do método, tabela 8.

Tabela 7. Contaminação das amostras de água para o cálculo da repetibilidade.

Conteúdo da amostra		
Amostra 13	Analista 2	<i>Ps. aeruginosa</i> WDCM 00024
Amostra 14	Analista 1	<i>Ps. aeruginosa</i> colónias brancas
Amostra 15	Analista 3	<i>Ps. aeruginosa</i> colónias brancas + <i>Ps. aeruginosa</i> colónias castanhas

Tabela 8. Contaminação das amostras de água para a verificação das características de performance do método.

Conteúdo da amostra		
Amostra 16	Analista 1	<i>Ps. aeruginosa</i> WDCM 00024 + <i>E. coli</i> WDCM 00012 + MIX 1
Amostra 17	Analista 1	<i>Ps. aeruginosa</i> WDCM 00024 + MIX 1
Amostra 18	Analista 1	<i>Ps. aeruginosa</i> colónias castanhas + <i>E. coli</i> WDCM 00012 + MIX 1
Amostra 19	Analista 1	<i>Ps. aeruginosa</i> colónias brancas + <i>E. coli</i> WDCM 00012 + MIX 1
Amostra 20	Analista 1	<i>Ps. aeruginosa</i> WDCM 00025

Em que MIX 1: *Enterococcus faecalis* WDCM 00087 + *Staphylococcus aureus* WDCM 00034 + *Bacillus subtilis* WDCM 00003

3.4 - Filtração por membrana das amostras contaminadas

As amostras contaminadas foram filtradas conforme mencionado em 2.1.5, ou seja, 100 mL de cada amostra de ACH foi filtrada através de membranas de porosidade de 0,45 µm e colocadas no meio CN (OXOID, Wesel, Alemanha). Posteriormente, foram incubadas a 36±2°C em aerobiose e as colónias contadas às 22±2 horas e às 44±4 horas.

3.5 - Repicagem das estirpes

Após o tempo de incubação e contagem das colónias repicaram-se as colónias suspeitas para meio que permitiu o seu crescimento, o meio TSA (Biokar Diagnostics, Beauvais, França).

A seguir, foram incubadas as placas de TSA (Biokar Diagnostics, Beauvais, França) durante 22 ± 2 horas a $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ porque após este tempo foram efetuadas as confirmações necessárias.

Na figura 22 é apresentada uma membrana com *Ps. aeruginosa* formadora de colónias verdes/azuis, na figura 23 *Ps. aeruginosa* formadora de colónias castanhas/vermelhas e na figura 24 *Ps. aeruginosa* formadora de colónias brancas.

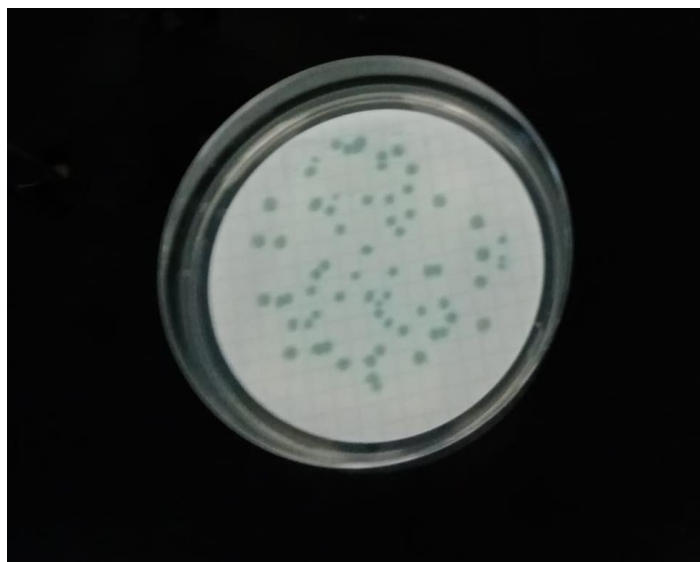


Figura 22. *Ps. aeruginosa* formadora de colónias verdes/azuis.



Figura 23. *Ps. aeruginosa* formadora de colónias castanhas/vermelhas.

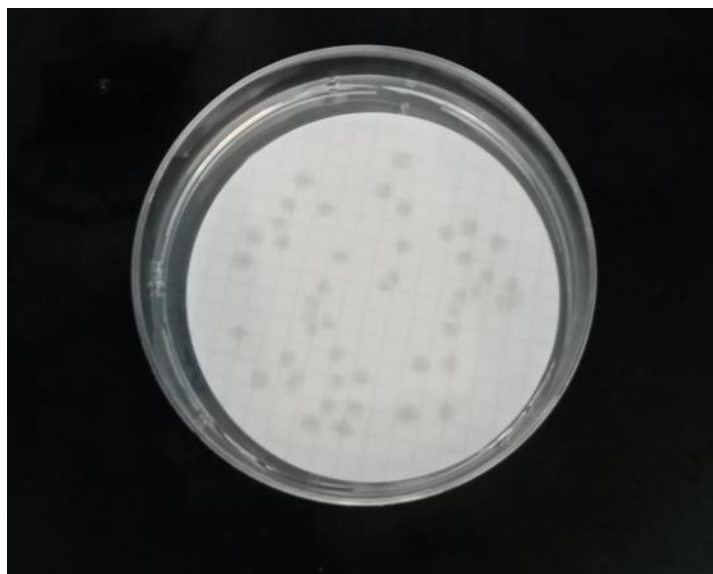


Figura 24. *Ps. aeruginosa* formadora de colónias brancas.

3.6 - Confirmação das estirpes

Na confirmação das colónias suspeitas de *Ps. aeruginosa*, consoante o tipo de colónias, estas foram confirmadas de acordo o estipulado na norma ISO 16266:2006. Contudo, na implementação do método, segundo o descrito na norma ISO 13843:2017 - Qualidade da água - Requisitos para o estabelecimento das características de desempenho dos métodos microbiológicos quantitativos, para avaliar a performance do método, as colónias devem ser confirmadas com um teste de confirmação secundário. Na tabela 9 está um resumo dos testes de confirmação obrigatórios e secundários que foram realizados.

Tabela 9. Testes de confirmação obrigatórios e secundários efetuados nas colónias de *Ps. aeruginosa*.

	Testes de confirmação obrigatórios	Testes de confirmação secundários
Colónias verdes/azuis e fluorescentes	Nenhum	Teste da oxidase
Colónias brancas	Produção de amónia	Produção de fluorescência
Colónias castanhas/vermelhas	Teste da oxidase Produção de fluorescência Produção de amónia	TSI

Em que: TSI (Agar Ferro de Açúcar Triplo)

3.6.1 - Colónias verdes/azuis

As colónias verdes/azuis e fluorescentes são imediatamente consideradas resultado positivo para a presença de *Ps. aeruginosa*. Contudo, foi realizado o teste da oxidase, com as tiras de oxidase (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Itália), como teste complementar e verificou-se que todas as colónias testadas ao teste da oxidase mudaram para cor azul, o que significa que testaram positivo.

3.6.2 - Colónias castanhas/vermelhas

As colónias castanhas/vermelhas são suspeitas de *Ps. aeruginosa* e foram efetuados três testes de confirmação: o teste da oxidase, o teste da produção de fluorescência e o teste da produção de amónia. Para além destes, foi realizado um teste complementar, que consistia em verificar a fermentação de açúcares, sendo usado o meio de cultura TSI (Biokar Diagnostics, Beauvais, França).

Inicialmente, realizou-se o teste da oxidase e todas as colónias testadas deram resultado positivo. Seguidamente, verificou-se a presença de fluorescência a partir do teste King B (Biokar Diagnostics, Beauvais, França) e verificou-se um resultado positivo, figura 25.



Figura 25. Produção de fluorescência pelas colónias castanhas/vermelhas através do teste King B.

De forma a garantir que os ensaios ocorreram sem qualquer desvio ao método, a fase das confirmações das colónias suspeitas foi acompanhada por um controlo positivo e por um controlo negativo. Desta forma, o controlo positivo foi efetuado inoculando *Ps. aeruginosa* no meio King B (Biokar Diagnostics, Beauvais, França) e o controlo negativo inoculando a espécie *E. coli*, que não é produtora de fluorescência, figura 26.

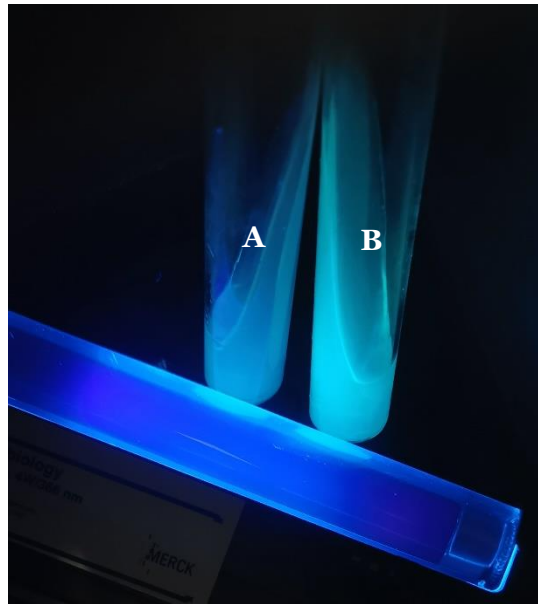


Figura 26. Controlo positivo e negativo no meio King B. A - Controlo negativo: *E. coli*. B - Controlo positivo: *Ps. aeruginosa*.

Continuamente, realizou-se o teste da produção de amónia a partir do caldo de acetamida (Biokar Diagnostics, Beauvais, França), ao qual se adicionou o reagente de Nessler (PanReac AppliChem, Barcelona, Espanha) e se verificou que todas as colónias testadas produziram amónia, figura 27. Do mesmo modo, foram efetuados os controlos positivo e negativo. O controlo positivo inoculado com a espécie *Ps. aeruginosa* e o controlo negativo com a espécie *E. coli*, que não consegue produzir amónia a partir da acetamida e consequentemente não há uma mudança de cor do meio para vermelho-tijolo, figura 28.



Figura 27. Produção de amónia a partir da acetamida pela *Ps. aeruginosa* formadora de colónias castanhas/vermelhas.



Figura 28. Controlo positivo e negativo no meio caldo de acetamida. A - Controlo positivo: *Ps. aeruginosa*. B - Controlo negativo: *E. coli*.

Por fim, e como teste complementar analisou-se a fermentação de açúcares através do meio TSI (Biokar Diagnostics, Beauvais, França). Este meio apresenta cor vermelha e na presença de microrganismos fermentadores muda a cor para amarelo - na rampa se forem fermentadores de lactose e/ou sacarose e na base se forem fermentadores da glucose -, devido ao indicador de pH vermelho de fenol. Uma vez que a espécie *Ps. aeruginosa* não é fermentadora o meio mantém-se vermelho, enquanto a *Salmonella* spp., espécie usada como controlo positivo, ao ser fermentadora produz uma mudança de cor do meio e, para além disso, ao ser produtora de sulfeto de hidrogénio vai levar ao aparecimento de um precipitado preto na parte inferior do agar e devido à formação de gás podem surgir fissuras, ruturas ou bolhas no meio, figura 29. Todas as colónias submetidas ao teste da fermentação de açúcares apresentaram rampa e base sem alteração de cor o que significa a presença de *Ps. aeruginosa*, tal como esperado, figura 30.

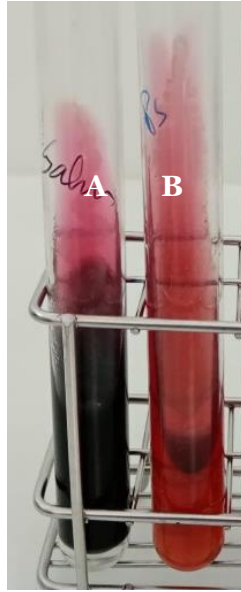


Figura 29. Controlo positivo e negativo no meio TSI. A - Controlo positivo: *Salmonella* spp.. B - Controlo negativo: *Ps. aeruginosa*.

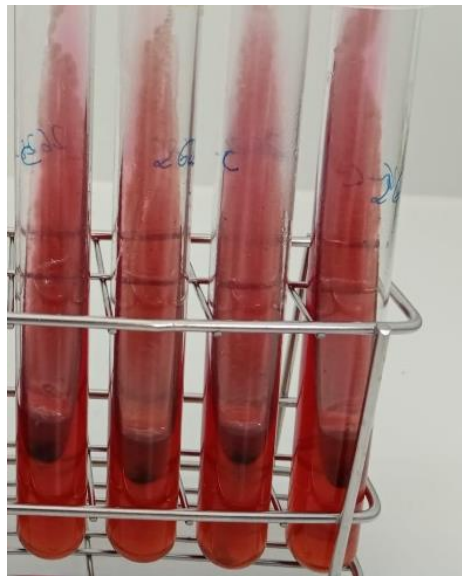


Figura 30. Avaliação de fermentação de açúcares através do meio TSI pela espécie *Ps. aeruginosa*.

3.6.3 - Colónias fluorescentes sem pigmento (brancas)

As colónias fluorescentes que não apresentam pigmento são suspeitas de *Ps. aeruginosa* e então realizou-se o teste da produção de amónia como teste de confirmação, ao qual todas as colónias testaram positivo, figura 31. Contudo, como teste complementar avaliou-se a produção de fluorescência a partir do meio King B (Biokar Diagnostics, Beauvais, França) e ao qual todas as colónias também se verificam positivas, figura 32.

3.7.1 - Esterilidade, produtividade e seletividade

Na esterilidade foi colocada uma placa de meio CN (OXOID, Wesel, Alemanha) nas condições de tempo e temperatura recomendadas para a análise da estirpe em estudo. Após o tempo de incubação nas respectivas condições não se verificou crescimento de colónias, o que indica que o meio é estéril. (ISO 11133:2014/Amd 2:2020, 2020).

Na produtividade (P_R) avaliou-se o nível de recuperação do microrganismo alvo no meio de cultura. Para tal, a partir das suspensões preparadas escolheu-se a diluição de forma a ter contagens aproximadamente de 80 UFC por placa e avaliou-se o rácio obtido entre o número de UFC obtidas no meio de cultura teste (N_S), neste caso o CN (OXOID, Wesel, Alemanha), e o número de UFC obtidas no meio de cultura de referência (N_O), sendo neste estudo utilizado o TSA (Biokar Diagnostics, Beauvais, França). (ISO 11133:2014/Amd 2:2020, 2020). Contudo, e de forma a evitar o aglomerado de colónias a análise foi feita em duplicado de maneira a obter menos colónias por placa para facilitar a contagem sendo no final feita a média dos duplicados. O cálculo para a P_R foi feito através da equação 1, definida pela ISO 11133:2014/Amd 2:2020.

$$P_R = \frac{N_S}{N_O} \quad (1)$$

Uma vez que, na análise foram utilizados dois lotes diferentes de CN (OXOID, Wesel, Alemanha), então o cálculo da produtividade foi efetuado para os dois lotes.

Lote A:

$$P_{R(A)} = \frac{\frac{N_S + N_S}{2}}{\frac{N_O + N_O}{2}} = \frac{\frac{48 + 36}{2}}{\frac{44 + 45}{2}} = \frac{42}{44,5} = 0,94 \quad (2)$$

Lote B:

$$P_{R(B)} = \frac{\frac{N_S + N_S}{2}}{\frac{N_O + N_O}{2}} = \frac{\frac{37 + 39}{2}}{\frac{41 + 44}{2}} = \frac{38}{42,5} = 0,89 \quad (3)$$

Obtidos os valores de 0,94 e 0,89 para a P_R dos meios de cultura, verificou-se que estes valores cumprem com o descrito na norma ISO 11133:2014/Amd 2:2020 que define que a P_R deve ser igual ou superior a 0,7, devido ao meio de cultura ser seletivo, e igual ou inferior

a 1,4. Uma vez que, ambos os lotes apresentaram produtividade superior a 0,7 conclui-se que o meio CN (OXOID, Wesel, Alemanha) apresenta uma boa produtividade.

Na seletividade avaliou-se o grau de inibição do microrganismo não alvo, isto é, avaliou-se se o meio tinha a capacidade de apenas permitir o crescimento da estirpe alvo impedindo o crescimento das restantes. Para tal, utilizou-se uma suspensão com o mínimo de 10^4 UFC e semeou-se o meio de cultura CN (OXOID, Wesel, Alemanha) com as estirpes *E. coli* e *Enterococcus faecalis* e incubaram-se as placas. Após o tempo de incubação verificou-se total inibição dos microrganismos não alvo, o que nos indica que o meio CN (OXOID, Wesel, Alemanha) apresenta uma boa seletividade. (ISO 11133:2014/Amd 2:2020, 2020).

3.8 - Verificação das características de performance do método

Na análise das características de performance do método são descritos os procedimentos efetuados com o intuito de verificar se o método é adequado ao fim a que se destina. Para tal, foi analisada a sensibilidade, a especificidade, a taxa de falsos positivos, a taxa de falsos negativos, a seletividade, a eficiência, a repetibilidade e a incerteza conforme a norma ISO 13843:2017. Para além destas análises foi também avaliada a precisão e a exatidão.

Para a verificação das características de performance do método foram contaminadas 5 amostras, como mencionado na tabela 8, estando apresentado na tabela 10 os resultados obtidos. Como referido anteriormente, todas as colónias suspeitas foram confirmadas também com um teste complementar, tabela 9. Após este passo, as características de performance do método foram calculadas de acordo com o número de colónias suspeitas e confirmadas nas 5 amostras.

Tabela 10. Resultados obtidos na avaliação das características de performance do método.

	Colónias suspeitas	Colónias confirmadas
Amostra 16	23 colónias verdes/azuis	23/23
Amostra 17	22 colónias verdes/azuis	22/22
Amostra 18	33 colónias castanhas/vermelhas	33/33
Amostra 19	43 colónias brancas	43/43
Amostra 20	43 colónias verdes/azuis	43/43
		164/164 (total)

3.8.1 – Sensibilidade, especificidade, taxa de falsos positivos, taxa de falsos negativos, seletividade e eficiência

Na sensibilidade aferimos se todas as colónias positivas são detetadas, isto é, se todas as colónias presuntivas positivas são efetivamente positivas, evitando assim os falsos negativos. (ISO 13843:2017, 2017).

Na especificidade examinamos se todas as colónias negativas são identificadas, isto é, se todas as colónias presuntivas negativas são concretamente negativas, evitando assim os falsos positivos. (ISO 13843:2017, 2017).

A taxa de falsos positivos representa a fração de colónias dadas como resultado positivo que posteriormente se verificam ser colónias de microrganismos não alvo. Enquanto, a taxa de falsos negativos representa a fração de colónias dadas como resultado negativo que posteriormente se verificam ser colónias do microrganismo alvo. (ISO 13843:2017, 2017).

A seletividade representa a razão entre o número de colónias alvo e o número total de colónias no volume da amostra. (ISO 13843:2017, 2017).

A eficiência representa a fração total de colónias atribuídas corretamente na contagem presuntiva. (ISO 13843:2017, 2017).

Estas características são expressas na forma de um diagrama 2x2 segundo a norma ISO 13843:2017, tabela 11, e apresenta-se os respetivos cálculos na tabela 12.

Tabela 11. Características de performance expressas num diagrama 2x2 segundo a norma ISO 13843:2017 - Qualidade da água - Requisitos para o estabelecimento das características de desempenho dos métodos microbiológicos quantitativos.

		Colónias presuntivas		Total de colónias
		+	-	
Colónias confirmadas	+	a	b	a+b
	-	c	d	c+d
		a+c	b+d	n

Onde:

a – número de colónias típicas confirmadas como sendo o microrganismo alvo no teste de confirmação primário, cuja identidade é apoiada pelo teste de identificação secundário (verdadeiros positivos).

b – número de colónias atípicas, ou colónias típicas negativas no teste confirmatório primário identificadas como sendo o microrganismo alvo pelo teste de identificação secundária (falsos negativos).

c – número de colónias típicas confirmadas como sendo o organismo alvo pelo teste de confirmação primário, que posteriormente se demonstra não serem o microrganismo alvo pelo teste de identificação secundário (falsos positivos).

d – número de colónias atípicas ou colónias típicas que são negativas no teste de confirmação primário que são demonstradas pelo teste de identificação secundária como não sendo o microrganismo alvo (verdadeiros negativos).

n – número total de colónias.

Tabela 12. Cálculo das características de performance do método com os resultados obtidos.

		Colónias presuntivas		Total de colónias
		+	-	
Colónias confirmadas	+	164	0	164
	-	0	0	0
		164	0	164

Onde:

$$\text{Sensibilidade} = a/(a+b) = 1 \text{ (em percentagem, 100\%)}$$

$$\text{Especificidade} = d/(c+d) = 0 \text{ (em percentagem, 0\%)}$$

$$\text{Taxa de falsos positivos} = c/(a+c) = 0 \text{ (em percentagem, 0\%)}$$

$$\text{Taxa de falsos negativos} = b/(b+d) = 0 \text{ (em percentagem, 0\%)}$$

$$\text{Seletividade} = a/n = 1 \text{ (em percentagem, 100\%)}$$

$$\text{Eficiência} = (a+d)/n = 1 \text{ (em percentagem, 100\%)}$$

3.8.2 - Repetibilidade

Na repetibilidade avaliamos a precisão dos resultados, para tal é realizada a análise de 10 replicados da mesma amostra nas mesmas condições, isto é, no mesmo dia, pelo mesmo técnico, num curto período de tempo, incubadas na mesma estufa e com o mesmo lote de meio de cultura. Para esta avaliação foram analisadas 3 amostras, tal como descrito na tabela 7. Os resultados das contagens estão representados na tabela 13 e os resultados do cálculo da média aritmética, da variância, da variância relativa operacional e do índice de dispersão de Poisson na tabela 14. (ISO 13843:2017, 2017).

Tabela 13. Contagem de colónias nas amostras de avaliação da repetibilidade.

		Contagens									
Amostra 13	43	45	26	36	30	30	28	31	37	32	
Amostra 14	74	62	66	65	61	55	65	67	50	46	
Amostra 15	64	78	78	66	70	68	55	67	69	67	

Tabela 14. Resultados do cálculo da média aritmética, da variância, da variância relativa operacional e do índice de dispersão de Poisson.

	Média aritmética	Variância	Variância relativa operacional	Índice de dispersão de Poisson
Amostra 13	33,8	39,956	0,005	10,639
Amostra 14	61,1	71,656	0,003	10,555
Amostra 15	68,2	43,956	-0,005	5,801

Onde:

Média aritmética (\bar{x}):

$$\frac{x_1+x_2+ \dots +x_n}{n} \quad (4)$$

Variância (s^2):

$$\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n-1} \quad (5)$$

Variância relativa operacional (u_0^2):

$$\frac{s^2-\bar{x}}{\bar{x}^2} \quad (6)$$

Índice de dispersão de Poisson (x_{n-1}^2):

$$\frac{n\sum x^2-(\sum x)^2}{\sum x} \quad (7)$$

A avaliação da repetibilidade é realizada comparando os valores do índice de dispersão de Poisson com o valor crítico de 5% da distribuição do Qui-Quadrado para 10-1 graus de liberdade: 16,919 (valor tabelado). Uma vez que, os 3 valores obtidos nas amostras analisadas são inferiores ao valor previsto pela distribuição de Qui-Quadrado podemos concluir que a dispersão dos microrganismos não é significativamente diferente da distribuição de Poisson. (ISO 13843:2017, 2017).

Para além disto, podemos verificar que a média da variância relativa operacional das 3 amostras é 0,001, o que leva a um resultado do desvio-padrão relativo da repetibilidade (%) de 3,2%, a partir da equação 8. (ISO 13843:2017, 2017).

$$\sqrt{u_0^2} \times 100 \quad (8)$$

3.8.3 - Incerteza

A incerteza é definida como um parâmetro que caracteriza a dispersão dos valores e permite atribuir ao mensurando um intervalo de valores aceitáveis. O cálculo da incerteza, tabela 15, foi feito de acordo com a norma ISO 29201:2012 - Qualidade da água - A variabilidade dos resultados dos testes e a incerteza da medição dos métodos de enumeração microbiológica.

Tabela 15. Cálculo da incerteza para a quantificação de *Pseudomonas*.

Amostra (n)	Analista (c1)	Analista (c2)	Resultados				Variância da reprodutibilidade (u ² _R)	Variância da distribuição (u ² _d)	Variância operacional (u ² _o)	
			n _{c1}	n _{c2}	Lg n _{c1}	Lg n _{c2}				(Lg n _{c1} - Lg n _{c2}) ² /2
1	1	3	46	54	1,6628	1,7324	0,0024	50,0	0,0038	0,0000
2	1	3	46	62	1,6628	1,7924	0,0084	54,0	0,0035	0,0049
3	1	3	44	54	1,6435	1,7324	0,0040	49,0	0,0038	0,0001
4	1	3	44	62	1,6435	1,7924	0,0111	53,0	0,0036	0,0075
5	2	1	36	46	1,5563	1,6628	0,0057	41,0	0,0046	0,0011
6	2	1	36	44	1,5563	1,6435	0,0038	40,0	0,0047	0,0000
7	2	1	41	46	1,6128	1,6628	0,0012	43,5	0,0043	0,0000
8	2	1	41	44	1,6128	1,6435	0,0005	42,5	0,0044	0,0000
9	3	5	64	41	1,8062	1,6128	0,0187	52,5	0,0036	0,0151
10	3	5	64	52	1,8062	1,7160	0,0041	58,0	0,0033	0,0008
11	3	5	60	41	1,7782	1,6128	0,0137	50,5	0,0037	0,0099
12	3	5	60	52	1,7782	1,7160	0,0019	56,0	0,0034	0,0000
13	4	6	30	31	1,4771	1,4914	0,0001	30,5	0,0062	0,0000
14	4	6	30	36	1,4771	1,5563	0,0031	33,0	0,0057	0,0000
15	4	6	48	31	1,6812	1,4914	0,0180	39,5	0,0048	0,0133
16	4	6	48	36	1,6812	1,5563	0,0078	42,0	0,0045	0,0033
17	5	4	37	33	1,5682	1,5185	0,0012	35,0	0,0054	0,0000
18	5	4	37	34	1,5682	1,5315	0,0007	35,5	0,0053	0,0000
19	5	4	30	33	1,4771	1,5185	0,0009	31,5	0,0060	0,0000
20	5	4	30	34	1,4771	1,5315	0,0015	32,0	0,0059	0,0000
21	6	2	31	27	1,4914	1,4314	0,0018	29,0	0,0065	0,0000

22	6	2	31	37	1,4914	1,5682	0,0030	34,0	0,0055	0,0000
23	6	2	34	27	1,5315	1,4314	0,0050	30,5	0,0062	0,0000
24	6	2	34	37	1,5315	1,5682	0,0007	35,5	0,0053	0,0000
25	2	3	31	45	1,4914	1,6532	0,0131	38,0	0,0050	0,0081
26	2	3	31	45	1,4914	1,6532	0,0131	38,0	0,0050	0,0081
27	2	3	34	45	1,5315	1,6532	0,0074	39,5	0,0048	0,0026
28	2	3	34	45	1,5315	1,6532	0,0074	39,5	0,0048	0,0026
29	1	4	75	56	1,8751	1,7482	0,0080	65,5	0,0029	0,0052
30	1	4	75	81	1,8751	1,9085	0,0006	78,0	0,0024	0,0000
31	1	4	70	56	1,8451	1,7482	0,0047	63,0	0,0030	0,0017
32	1	4	70	81	1,8451	1,9085	0,0020	75,5	0,0025	0,0000
33	3	5	26	29	1,4150	1,4624	0,0011	27,5	0,0069	0,0000
34	3	5	26	35	1,4150	1,5441	0,0083	30,5	0,0062	0,0021
35	3	5	28	29	1,4472	1,4624	0,0001	28,5	0,0066	0,0000
36	3	5	28	35	1,4472	1,5441	0,0047	31,5	0,0060	0,0000
37	4	6	55	65	1,7404	1,8129	0,0026	60,0	0,0031	0,0000
38	4	6	55	68	1,7404	1,8325	0,0042	61,5	0,0031	0,0012
39	4	6	61	65	1,7853	1,8129	0,0004	63,0	0,0030	0,0000
40	4	6	61	68	1,7853	1,8325	0,0011	64,5	0,0029	0,0000
41	5	4	45	53	1,6532	1,7243	0,0025	49,0	0,0038	0,0000
42	5	4	45	59	1,6532	1,7709	0,0069	52,0	0,0036	0,0033
43	5	4	38	53	1,5798	1,7243	0,0104	45,5	0,0041	0,0063
44	5	4	38	59	1,5798	1,7709	0,0183	48,5	0,0039	0,0144
45	4	3	50	75	1,6990	1,8751	0,0155	62,5	0,0030	0,0125
46	4	3	50	71	1,6990	1,8513	0,0116	60,5	0,0031	0,0085
47	4	3	53	75	1,7243	1,8751	0,0114	64,0	0,0029	0,0084
48	4	3	53	71	1,7243	1,8513	0,0081	62,0	0,0030	0,0050
							0,0059		0,0044	0,0026

Em suma, os resultados são os seguintes:

Variância da distribuição (variância intrínseca) - $u^2_d = 0,0044$

Variância da distribuição relativa (variância intrínseca relativa) - $u^2_{d,rel} = 0,0233$

Incerteza intrínseca - $u_d = 0,0663$

Incerteza intrínseca relativa - $u_{d,rel} = 15\%$

Variância operacional - $u^2_o = 0,0026$

Variância operacional relativa - $u^2_{o,rel} = 0,0138$

Incerteza operacional - $u_o = 0,0510$

Incerteza operacional relativa - $u_{o,rel} = 12\%$

O cálculo foi feito a partir da análise em paralelo de 48 amostras naturais contaminadas com *Ps. aeruginosa* WDCM 00024, *Ps. aeruginosa* colónias brancas, *Ps. aeruginosa* colónias castanhas e *Ps. putida* ATCC 49128, conforme descrito na tabela 6, obtendo-se assim o valor de incerteza operacional relativa de 12%.

3.8.4 - Precisão

A precisão mede a proximidade dos resultados dos ensaios, sendo o critério de precisão intermediária para a quantificação de *Ps. aeruginosa* em ACH apurado a partir da análise de ensaios em duplicado e em paralelo, a partir dos quais é possível o cálculo da amplitude média e estabelecido o critério de aceitação de resultados a usar no CQ de rotina, conforme representado no figura 33.

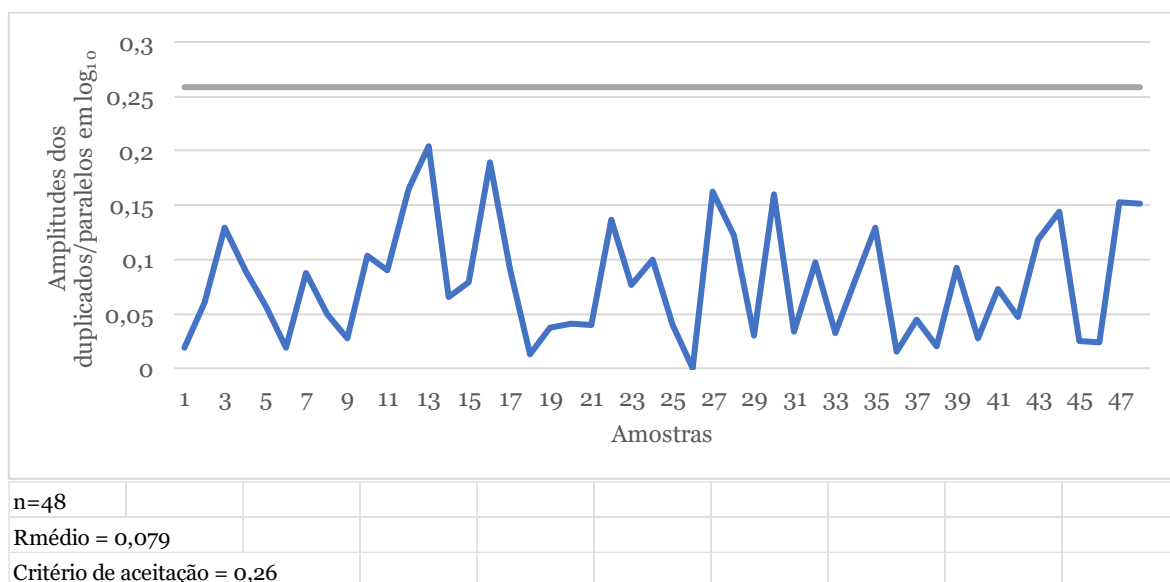


Figura 33. Cálculo da precisão intermediária e do critério de aceitação.

A partir de 48 amostras (duplicados/paralelos) analisadas, obteve-se um $R_{\text{médio}}$ de 0,079 o que leva a um critério de aceitação de 0,26 \log_{10} , com base na equação 9.

$$R_{\text{médio}} \times 3,27 \quad (9)$$

3.8.5 - Exatidão

A exatidão mede a proximidade entre os resultados de um ensaio com os resultados reais. Este laboratório já participou em inúmeros ensaios interlaboratoriais e apresenta um vasto histórico de bons resultados em várias matrizes de águas, incluindo ACH, o que é um indicador de resultados fidedignos. Para além disso, os resultados obtidos apresentaram-se

dentro da amplitude apresentada pelo programa organizador, sendo por isso considerados satisfatórios.

Capítulo 4 - Conclusão

Pseudomonas aeruginosa é um microrganismo que pode ser encontrado nos mais variados ambientes, desde naturais a hospitalares. Este fator pode ser atribuído à sua grande versatilidade genética. Além disso, esta particularidade também lhe permite produzir diversos fatores de virulência e fornecer uma grande resistência a antibióticos. Todas estas características e a capacidade de formar biofilmes contribuem para que *Ps. aeruginosa* possa causar graves problemas a nível de saúde pública.

A nível legislativo não existe uma obrigatoriedade para a análise deste parâmetro em águas de consumo humano. Contudo, devido ao perigo que pode representar para a saúde pública, principalmente para doentes imunocomprometidos e/ou hospitalizados, é aconselhável a sua pesquisa em determinados ambientes.

Com este trabalho pretendeu-se implementar o método “Deteção e enumeração de *Ps. aeruginosa* em águas de consumo humano”, garantindo assim que o laboratório além de estar apto para efetuar este ensaio, produz dados de desempenho similares aos dados estabelecidos numa validação primária.

Durante o estudo de implementação, foi verificado se o meio de cultura cumpria com o estipulado na norma ISO 11133:2014/Amd 2:2020. Para além disso, foram avaliados os parâmetros descritos na norma ISO 13843:2017 para a verificação do método: sensibilidade, especificidade, taxa de falsos positivos, taxa de falsos negativos, eficiência, repetibilidade e estimativa da incerteza. Ainda foi calculado o critério de precisão e avaliada a exatidão.

Na análise de controlo de qualidade ao meio de cultura, verificou-se que o meio de cultura se encontrava estéril, seletivo e apresentava taxas de produtividade de 0,94 e 0,89. Concluindo que o meio de cultura utilizado nos ensaios cumpria com o controlo de qualidade estipulado.

Na avaliação das características de performance do método, constatou-se que o método é 100% sensível, seletivo e eficiente, 0% específico e com uma taxa de falsos positivos e falsos negativos nula. No cálculo da repetibilidade, que apresentou um resultado de 3,2%, permitiu concluir que a dispersão dos microrganismos, nas 3 amostras analisadas para o efeito, não é significativamente diferente da distribuição de Poisson. Na estimativa da incerteza, foram analisadas 48 amostras de água de consumo humano em paralelo e onde todas as componentes possíveis foram variadas, tendo sido obtido um valor de incerteza operacional relativa de 12%.

O critério de precisão foi obtido a partir de 48 amostras, para tal foram usados resultados obtidos em ensaios efetuados em duplicado e em paralelo, tendo sido obtido um valor de $0,26 \log_{10}$ como critério de aceitação.

Como laboratório acreditado, e no cumprimento do estipulado na norma NP EN ISO/IEC 17025:2018, o laboratório participa regularmente em ensaios interlaboratoriais, avaliando assim a sua exatidão. Os resultados obtidos apresentaram-se dentro da amplitude apresentada pelo programa organizador, sendo por isso considerados satisfatórios.

Avaliando todos os resultados obtidos e sendo estes realizados por analistas qualificados pode-se concluir que a metodologia é adequada aos fins a que se destina e que o laboratório se encontra apto para efetuar este ensaio.

A nível pessoal, este estágio curricular foi muito enriquecedor. Uma vez que, fui parte integrante na rotina de um laboratório e adquiri diversos conhecimentos nos diferentes setores do laboratório de microbiologia, desde a preparação dos meios, à análise das águas, dos alimentos e dos cosméticos, às repicagens, às leituras e confirmações e, por fim, à preparação de culturas de trabalho e de suspensões para teste. Para além da rotina do laboratório acompanhei e participei na implementação do método “Deteção e enumeração de *Ps. aeruginosa* em águas de consumo humano”, um método importante a nível de saúde pública, que me permitiu aprender os procedimentos necessários para que isso fosse possível. Desde a leitura e conhecimento das normas, à contaminação de águas para os fins propostos, à análise das águas e, por fim, à interpretação dos resultados obtidos.

Bibliografia

- ALS. “ALS Locations”, 2024. Disponível em: <https://www.alsglobal.com/pt/ALS-locations>. Acesso em: 22 de janeiro de 2024;
- ALS. “Site da ALS”, 2024. Laboratório de análises, inspeção, certificação e verificação. Disponível em: <https://www.alsglobal.com/>. Acesso em: 22 de janeiro de 2024;
- Brooks, George F., Ernest Jawetz, Melnick Joseph L., and Adelberg Edward A. (2013). *Jawetz, Melnick & Adelberg’s Medical Microbiology*, (26), 44 e 245-247, New York: McGraw-Hill;
- Decreto-Lei n.º 69/2023, de 21 agosto. Diário da República n.º 161/2023, Série I. Ministério do Ambiente e Ação Climática. Lisboa;
- Deliberali, B., Myiamoto, K. N., Winckler Neto, C. H. D. P., Pulcinelli, R. S. R., Aquino, A. R. do C., Vizzotto, B. S., & Santos, R. C. V. (2011). Prevalência de bacilos Gram-negativos não fermentadores de pacientes internados em Porto Alegre-RS. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 47(5), 529–534. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442011000500006>;
- Diggle, Stephen P., and Marvin Whiteley. (2020). “Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: Opportunistic Pathogen and Lab Rat.” *Microbiology*, 166(1), 30–33. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000860>;
- El-Fouly, M.Z., A.M. Sharaf, A.A.M. Shahin, Heba A. El-Bialy, and A.M.A. Omara. (2015). “Biosynthesis of Pyocyanin Pigment by *Pseudomonas aeruginosa*.” *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 8(1), 36–48. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2014.10.007>;
- Garvey, Mark I., Craig W. Bradley, and Elisabeth Holden. (2018). “Waterborne *Pseudomonas aeruginosa* Transmission in a Hematology Unit?” *American Journal of Infection Control*, 46(4), 383–386. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2017.10.013>;
- Horna, Gertrudis, and Joaquim Ruiz. (2021). “Type 3 Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa*.” *Microbiological Research*, 246, 126719, Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126719>;
- Hossain, Z. (2014). “Bacteria: *Pseudomonas*.” In *Encyclopedia of Food Safety*, 1, 490–500, Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00109-8>;
- ISO 11133:2014/Amd 2:2020. “Microbiology of food, animal feed and water - Preparation, production, storage and performance testing of culture media”. 1ª Edição. 2020;

- ISO 13843:2017. “Water quality - Requirements for establishing performance characteristics of quantitative microbiological methods”. 1ª Edição. 2017;
- ISO 16266:2006. “Water quality - Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* - Method by membrane filtration”. 1ª Edição. 2006;
- ISO 29201:2012. “Water quality - The variability of test results and the uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods”. 1ª Edição. 2012;
- Madigan, Michael T., John M. Martinho, David A. Stahl, and David P. Clark. (2012). *BROCK, Biology of Microorganisms*, (13), 490 e 675, San Francisco: Benjamin Cumming;
- Mielko, Karolina Anna, Sławomir Jan Jabłoński, Justyna Milczewska, Dorota Sands, Marcin Łukaszewicz, and Piotr Młynarz. (2019). “Metabolomic Studies of *Pseudomonas aeruginosa*.” *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(11), 178. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2739-1>;
- Morand, A., and J.-J. Morand. (2017). “*Pseudomonas aeruginosa* En Dermatologie.” *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*, 144(11), 666–675. <https://doi.org/10.1016/j.annder.2017.06.015>;
- NP EN ISO/IEC 17025:2018. “Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração”. 1ª Edição. 2018;
- Opperman, Christoffel J., Clinton Moodley, Katie Lennard, Mariette Smith, Jabulani Ncayiyana, Mjikisile Vulindlu, Musarrat Gafoor, et al. (2022). “A Citywide, Clonal Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa*.” *International Journal of Infectious Diseases*, 117, 74–86. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.01.039>;
- PanReac AppliChem. “Tiras de la Oxidasa para microbiología”. Barcelona: PanReac AppliChem (s.d.). Disponível em https://www.pvl.pt/site/uploads/produtos/documentos/571C92F2-00270_1.pdf. Acesso em: 23 de janeiro de 2024;
- Portaria n.º 1220/2000, de 29 de dezembro. Diário da República n.º 299/2000, Série I-B. Ministério da Economia e da Saúde. Lisboa;
- Sathe, Nikhil, Peter Beech, Larry Croft, Cenk Suphioglu, Arnab Kapat, and Eugene Athan. (2023). “*Pseudomonas aeruginosa*: Infections and Novel Approaches to Treatment ‘Knowing the Enemy’ the Threat of *Pseudomonas aeruginosa* and Exploring Novel Approaches to Treatment.” *Infectious Medicine*, 2(3), 178–194. <https://doi.org/10.1016/j.imj.2023.05.003>;

PVL. “Tiras de Oxidase 50 T”, (s.d.). Disponível em <https://www.pvl.pt/index.php?route=base/pt/produto/1124/tiras-de-oxidase-50-t>. Acesso em: 23 de janeiro de 2024;

Solabia Group. “Acetamide Broth”, 2022. Disponível em <https://www.solabia.com/biokar-diagnostics/en/product/ACETAMIDE-BROTH/>. Acesso em: 24 de janeiro de 2024;

Solabia Group. “King B Agar”, 2022. Disponível em <https://www.solabia.com/biokar-diagnostics/en/product/KING-B-AGAR/>. Acesso em: 28 de maio de 2024;

Willey, Joanne M., Linda Sherwood, and Christopher J. Woolverton. (2014). *Prescott's Microbiology*, (9), 527 e 799, New York: McGraw-Hill.

Anexo A - Preparação dos meios e reagentes de confirmação de *Pseudomonas aeruginosa*

O agar nutriente é preparado dissolvendo os compostos: peptona, extrato de carne, extrato de levedura, cloreto de sódio (NaCl) e agar, nas quantidades presentes na tabela A1 em 1 litro de água por aquecimento. Posteriormente, é esterilizado a $121\pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos e deve ter um pH correspondente a $7,4\pm 0,2$ a 25°C . Após preparado deve ser armazenado no escuro e a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$, de modo a evitar a dessecação e deve ser utilizado no prazo de 1 mês.

Tabela A1. Constituintes e respectivas quantidades do agar nutriente.

Constituintes	Quantidade (g)
Peptona	5,0
Extrato de carne	1,0
Extrato de levedura	2,0
NaCl	5,0
Agar	15,0

O reagente oxidase é apenas composto por dicloridrato de tetrametil-p-fenilenodiamina, cuja quantidade está apresentada na tabela A2, dissolvido em 10 mL de água. Devido à instabilidade deste reagente, este deve ser usado imediatamente após a sua preparação e protegido da luz.

Tabela A2. Constituintes e respectivas quantidades do reagente oxidase.

Constituintes	Quantidade (g)
dicloridrato de tetrametil-p-fenilenodiamina	0,1

O meio King B é composto por peptona, hidrogenofosfato dipotássico (K_2HPO_4), sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e agar, cujas quantidades estão presentes na tabela A3. Este meio é preparado adicionando estes compostos, nas respectivas quantidades, a 1 litro de água aquecendo e adicionando 10 mL de glicerol. O meio terá de arrefecer até aos $45-50^{\circ}\text{C}$ e o pH deverá corresponder a $7,2\pm 0,2$ a 25°C (o pH deverá ajustar-se com HCl ou NaOH caso seja necessário acidificar ou tornar mais básico, respetivamente). O meio King B deverá ser distribuído em alíquotas de 5 mL em tubos de ensaio e ser esterilizado a $121\pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos. Após os tubos arrefecerem devem ser colocados inclinados de modo a haver a formação de uma rampa e armazenados no escuro a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ e utilizados no prazo de 3 meses.

Tabela A3. Constituintes e respectivas quantidades do meio King B.

Constituintes	Quantidade (g)
Peptona	20,0
K ₂ HPO ₄	1,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,5
Agar	15,0

O caldo de acetamida é preparado adicionando 1 mL de Solução B, cujos constituintes e respectivas quantidades estão na tabela A4 e se dissolvem em 100 mL de água, a 900 mL de Solução A, cuja constituição com as quantidades pertencentes se apresentam na tabela A5 e se dissolvem em 900 mL de água, cujo pH deverá corresponder a $7,0 \pm 0,5$ a 25°C. Consequente, acrescenta-se água até perfazer o volume de 1 L, sempre em agitação constante. Este meio deverá ser distribuído em alíquotas de 5 mL em tubos de ensaio e ser esterilizado a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ durante 15 minutos. Após os tubos arrefecerem devem ser armazenados no escuro a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ e utilizados no prazo de 3 meses.

Tabela A4. Constituintes e respectivas quantidades da Solução B do caldo de acetamida.

Constituintes	Quantidade (g)
Molibdato de sódio (Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O)	0,5
Sulfato de ferro heptahidratado (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	0,05

Tabela A5. Constituintes e respectivas quantidades da Solução A do caldo de acetamida.

Constituintes	Quantidade (g)
Di-hidrogenofosfato de potássio (KH ₂ PO ₄)	1,0
Sulfato de magnésio (MgSO ₄)	0,2
Acetamida*	2,0
NaCl	0,2

* A acetamida é cancerígena e irritante o que implica que devem ser tomadas as precauções apropriadas quando se manuseia.

O reagente de Nessler é composto por cloreto de mercúrio, iodeto de potássio e hidróxido de sódio, cujas quantidades estão presentes na tabela A6.

Tabela A6. Constituintes e respectivas quantidades do reagente de Nessler.

Constituintes	Quantidade (g)
HgCl ₂ *	10
KI	7
NaOH	16

* O HgCl₂ é tóxico e deve-se evitar a sua ingestão.

Este meio é preparado dissolvendo o HgCl_2 e o KI numa pequena quantidade de água e, posteriormente, adicionar lentamente, com agitação, a uma solução fria de NaOH, previamente dissolvido em 50 mL de água. No final, perfazer o volume para 100 mL com água e armazenar num recipiente adequado com vidro borossilicato com rolha de borracha, protegido da luz solar e por um período máximo de 1 ano.