

MICROBIOLOGIA BÁSICA (BMM-271) - ODONTOLOGIA - NOTURNO 2018

Carga Horária ; 60 horas Créditos: 4

DATAS	Teóricas		Teóricas ou práticas	
Abril 05 - Quinta	Introdução - Características gerais e multiplicação dos vírus (T)	Menck	Multiplicação Viral (T)	Menck
12 - Quinta	Vírus respiratórios (T)	Durigon	Vírus dermatotrópicos (T)	Durigon
19 - Quinta	Citologia e morfologia bacterianas – Prática 1 Técnicas de semeadura e isolamento – Prática 2 Coloração de Gram - Prática 3	Marcio/Rita	Morfologia e estruturas bacterianas (T)	Marcio
26 - Quinta	Nutrição bacteriana/Meios de cultura (T) Metabolismo bacteriano (T)	Marcio	Genética bacteriana (T)	Robson
Mai 03 - Quinta	Controle microbiano por agentes físicos e químicos - Prática 4 Antibiograma - Prática 5	Marcio/Rita	Controle microbiano por métodos químicos e físicos (T)	Marcio
10 - Quinta	Leitura/Discussão - Prática 4 Leitura/Discussão - Prática 5	Marcio/Rita	Antimicrobianos: Mecanismos de ação (T)	Marcio
17- Quinta	Antimicrobianos: Mecanismos de resistência (T)	Marcio	Mecanismos de virulência bacteriana – Patogenicidade (T)	Marcio/Rita
24 - Quinta	AVALIAÇÃO I	Marcio/Rita	Microbiota residente humana (T)	Robson
Junho 07 - Quinta	SEMINÁRIOS (Adote uma Bactéria : Odonto 2017)*	Marcio/Rita/ Robson	SEMINÁRIOS (Adote uma Bactéria : Odonto 2017)*	Marcio/Rita/Robson
14 - Quinta	SEMINÁRIOS (Adote uma Bactéria : Odonto 2017)*	Marcio/Rita/ Robson	Características gerais dos fungos	Taborda/Kelly
21 - Quinta	Antifúngicos – mecanismos de ação e de resistência	Taborda/Kelly	Morfologia e diversidade dos fungos – Prát.7 Testes de susceptibilidade aos antifúngicos – Prática 8	Taborda/Kelly
28 - Quinta	AVALIAÇÃO II (Prova Final)	Robson/Rita	AVALIAÇÃO SEMINÁRIOS	Robson/Rita
*Adote uma Bactéria	. <i>Streptococcus</i> . <i>Mycobacterium</i> . <i>Clostridium</i> . <i>Lactobacillus</i>			

Coordenador: Prof. Marcio V. B. Dias (Noturno) – mvbdias@usp.br

Docentes colaboradores: Prof. Rita de Cássia Café Ferreira, Prof. Robson Francisco de Souza ; Profa. Kelly Ishida; Prof. Carlos Taborda

Aluno PAE: Fagner James Martins Dantas Costa

Técnicos: Eduardo Gimenes ---- Tatiana Reis ----- Zita Gregório --- Carol -----

Conteúdo das Provas:

Prova I: Conteúdo das aulas dos dias 05 de abril a 03 de maio (teórico e prático, com exceção da prática 05) (peso 4)

Prova II: Conteúdo das aulas dos dias 10 de maio a 21 de junho (teórico e prático, com exceção da prática 04) (peso 4)

Prova de Seminários: Englobará questões de todos os seminários. (peso 2)

Seminários:

Os Seminários devem abranger os seguintes tópicos: morfologia do microrganismo, condições de cultivo, fatores de virulência, mecanismos de patogenicidade, manifestações clínicas, transmissão, epidemiologia, diagnóstico, tratamento e controle da doença.

As instruções referentes ao ADOTE serão passadas pela Prof. Rita. (Peso 2)

Durante a apresentação dos seminários ou outra atividade do ADOTE serão realizadas perguntas dos professores e alunos PAEs. Além disso, serão escolhidos alunos aleatoriamente do resto da sala para realizarem perguntas gerais, além das perguntas dos alunos com qualquer dúvida. Essas perguntas não envolverão em penalidades ou benefícios para o grupo que apresenta ou quem pergunta, respectivamente. Os alunos também podem manifestar suas experiências relacionadas com os temas para enriquecer as aulas. PORÉM, caso o aluno tenha assinado a lista de presença, mas não esteja em aula, e seu nome foi chamado para realizar perguntas, além da presença cancelada do aluno, este terá 1 ponto descontado da nota do seminário.

Relatórios das aulas práticas:

Data de entrega: o relatório da aula prática é individual e deverá ser entregue uma semana após o término da prática contendo apenas os resultados e discussão e referência em no máximo 2 páginas, contendo: Introdução, Objetivos, Materiais e Métodos, Resultados e Discussão, Respostas das perguntas, Referências. (peso 1)

Observação: Os conteúdos de aulas expositivas, exercícios, seminários e de aulas práticas podem ser temas das avaliações.

Avaliação:

Cálculo da nota final:

$$M = \frac{(PI \times 4) + (PII \times 4) + (S \times 2) + (PS \times 2) + (R \times 1)}{13}$$

Sendo PI= Nota da Prova I; PII = nota da Prova II, S= Nota do Seminário; PS = Nota da Prova de seminário e R = nota dos relatórios das aulas práticas.

PROVA SUBSTITUTIVA: Será oferecida **somente** para o aluno que faltou em uma das provas **com justificativa** (por Ex.: atestado médico ou comprovante de apresentação de trabalho em eventos científicos). Conteúdo: **Prova que perdeu.**

PROVA DE RECUPERAÇÃO: Será fornecida uma prova de recuperação para os alunos com nota final inferior a 5,0 e superior ou igual a 3,0 e com 70% de presença. Conteúdo: **Toda a Matéria.**

DATAS DAS PROVAS SUBSTITUTIVAS E DE RECUPERAÇÃO:

Prova	Data	Horário
Substitutivas	05/07/2018 – Quinta-feira	18 h
Recuperação	12/07/2018 – Quinta-feira	18 h

Bibliografia

Microbiologia de Brock 12ª ed (2010). Madigan M., Martinco J., Parker J., Prentice Hall Ed
Microbiologia 10ª ed (2012). Tortora G., Funke B., Case C., Artmed Ed
Microbiologia 5ª ed (2008). Trabulsi L.R., Alterthum F., Atheneu
Microbiologia Conceitos e Aplicações 3ª ed (2000). Pelczar M., Chan E., Krieg N. Makron Books
Microbiologia Médica 6ª ed (2010). Murray, P. Rosenthal, K., Kobayashi, G., Pfaller, M. Elsevier Ed.
Microbe (2006). Schaecter, M., Ingraham, J.L., Neidhardt, F.C. ASM Press.
Principles of Virology 3ª Ed. (2011). Flint, Enquist, Rocaniello e Skalka.
Fields Virology 5ª Ed.(2007). Knipe & Howley. (disponível no SiBi)
Antibiotics: Actions, origins, resistance. (2003). Walsh, CT, ASM Press.

Sites interessantes em Virologia:

http://www.youtube.com/playlist?feature=plcp&list=PLGhmZX2NKiNmXpqUYHnzn_CbnghtNhWld
<http://www.microbiologybytes.com/introduction/structure.html>
<http://www.cgl.ucsf.edu/Research/virus/capsids/viruses.html>
http://www.virology.net/Big_Virology/BVHomePage.html
<http://www.youtube.com/watch?v=Rpj0emEGShQ&feature=related>
<http://www.youtube.com/watch?v=B7ITZgag6w0&NR=1>

Sites interessantes em Bacteriologia

http://bervieira.sites.uol.com.br/bac_online.htm
<http://microbiologia.com.sapo.pt/bac1.htm>
<http://science.jrank.org/pages/714/Bacteria.html>
<http://pathmicro.med.sc.edu/book/bact-sta.htm>
http://pt.wikibooks.org/wiki/Biologia_celular/Bact%C3%A9rias

Apostila Aulas Práticas



MICROBIOLOGIA BÁSICA (BMM-271)

ODONTOLOGIA

NOTURNO 2018

BMM 271 – Microbiologia Básica

“NOÇÕES ELEMENTARES DE SEGURANÇA PARA OS LABORATÓRIOS DIDÁTICOS DE MICROBIOLOGIA - DISCIPLINA BMM271-NOTURNO”

APRESENTAÇÃO

Este texto foi preparado pela CIPA (Comissão Interna de Prevenção de Acidentes) e alguns docentes dos cursos introdutórios de laboratório do Instituto de Química e adaptado para o Instituto de Ciências Biomédicas. Seu objetivo é prevenir a ocorrência de acidentes durante a realização de experimentos e esse objetivo somente será alcançado com sua colaboração.

Quando estamos no ICB, estamos expostos às mais variadas situações de risco, devido à própria natureza da atividade que se desenvolve aqui: diferentes micro-organismos com diferentes graus de periculosidade à saúde humana, substâncias corrosivas e tóxicas, materiais radioativos. O primeiro passo para se evitar um acidente é saber reconhecer as situações que podem desencadeá-lo. Em seguida, é preciso conhecer e aplicar uma série de regras básicas de proteção individual e coletiva. Nas páginas seguintes você encontrará um grande número dessas recomendações; segui-las não somente contribuirá para seu bem-estar pessoal como, também, para sua formação profissional.

NORMAS DE SEGURANÇA

Segurança é assunto de máxima importância e especial atenção deve ser dada às medidas de segurança pessoal e coletiva em laboratório. Embora não seja possível enumerar aqui todas as normas de segurança em laboratório, existem certos cuidados básicos, decorrentes do uso de bom senso e de conhecimento científico, que devem ser observados. As normas foram divididas em cinco grupos: as que se referem à parte física do laboratório, às atitudes que o laboratorista deve ter, a seu trabalho no laboratório, à limpeza do laboratório e do material e aos procedimentos em caso de acidente.

O laboratório

1. Conheça a localização da saída de emergência, do chuveiro de emergência, do lava-olhos, dos extintores de incêndio, dos registros de gás de cada bancada e das chaves gerais (elétricas). Saiba usar estes dispositivos.
2. Mantenha as janelas abertas para ventilar o laboratório.
3. Verifique se os cilindros de gás sob pressão estão presos com correntes ou cintas.

4. Ao se retirar do laboratório, verifique se não há torneiras (água ou gás) abertas. Desligue todos os aparelhos.

As atitudes

5. É expressamente proibido que os alunos subtraíam qualquer material biológico e químico (especialmente solventes), vidraria ou equipamento (micropipetas, eletrodos, balanças, etc.) dos laboratórios didáticos. Estes materiais podem ser utilizados somente para a execução de experiências em aulas práticas e os infratores desta norma estarão sujeitos às sanções disciplinares e legais previstas no regimento interno da USP.

6. Use *avental* devidamente fechado e de manga comprida.

7. Não use sandálias ou chinelos, que não protegem de respingos e de queda de objetos. Use somente *sapatos fechados*, de preferência de couro.

8. *Prenda seu cabelo* se for comprido. Pode pegar fogo.

9. Não fume, não coma e não tome nada no laboratório. Isto pode contaminar reagentes, comprometer aparelhos e provocar intoxicação.

10. Não coloque bolsas, malhas, livros, etc. sobre a bancada, mas apenas o caderno de anotações, caneta e calculadora.

11. Não brinque no laboratório. Esteja sempre atento ao experimento que está sendo realizado.

13. Não trabalhe sozinho no laboratório. É preciso haver outra pessoa para ajudar em caso de emergência. O trabalho experimental no laboratório pode ser executado somente na presença do *professor* responsável.

14. Não receba colegas no laboratório. Atenda-os no corredor. Apenas alunos da disciplina podem adentrar ao laboratório.

15. Siga rigorosamente as instruções fornecidas pelo professor.

16. Consulte o professor antes de fazer qualquer modificação no andamento da experiência e na quantidade de reagentes a serem usados.

17. Caso esteja usando um aparelho pela primeira vez, leia sempre o manual antes e consulte o professor.

18. Nunca teste um produto químico ou material biológico pelo sabor (por mais apetitoso que ele possa parecer).

19. Não teste um produto químico ou material biológico pelo odor.

O trabalho

20. Para pipetar, use seringa, pêra de borracha ou pipetador para aspirar o líquido. Nunca aspire líquidos com a boca.

21. Evite contato de qualquer substância com a pele.
22. Encare todos os produtos químicos e microbiológicos como potencialmente nocivos à saúde, enquanto não verificar sua inocuidade, consultando a literatura especializada.
23. Conheça as propriedades físicas, químicas e toxicológicas das substâncias assim como o nível de periculosidade dos micro-organismos com que vai lidar, bem como métodos de descarte dos resíduos gerados. Consulte a bibliografia.
24. Antes de usar qualquer reagente, leia cuidadosamente o rótulo do frasco para ter certeza de que aquele é o reagente desejado.
25. Conserve os rótulos dos frascos, pois contêm informação importante.
26. Não aqueça líquidos inflamáveis em chama direta.
27. Nunca deixe frascos contendo solventes inflamáveis (por exemplo: acetona, álcool, éter) próximo a uma chama.
28. Nunca deixe frascos contendo solventes inflamáveis expostos ao sol.
29. Não armazene substâncias oxidantes próximo a líquidos voláteis e inflamáveis.
30. Abra frascos o mais longe possível do rosto e evite aspirar ar naquele exato momento.
31. Nunca torne a colocar no frasco uma droga retirada em excesso e não usada. Ela pode ter sido contaminada.
32. Nunca aqueça o tubo de ensaio, apontando sua extremidade aberta para um colega ou para si mesmo.
33. Cuidado ao aquecer vidro em chama: o vidro quente tem exatamente a mesma aparência do frio.
34. **Não deixe bicos de Bunsen acesos à toa.**
35. Dedique especial atenção a qualquer operação que necessite aquecimento prolongado ou que libere grande quantidade de energia.
36. Use luva térmica para tirar material quente da estufa.
37. Use luva de pano ou simplesmente um pano para proteger a mão ao inserir um tubo de vidro ou um termômetro numa rolha.

A limpeza

38. Água ou outros produtos derramados e **não** contaminados no chão podem tornar o piso escorregadio. Providencie imediatamente a limpeza.
39. A bancada de trabalho deve ser mantida limpa e seca para evitar que se entre inadvertidamente em contato com uma substância tóxica, corrosiva ou biologicamente perigosa.

- 40. Não jogue papéis ou outros sólidos nas pias. Provocam entupimentos.
- 41. Não jogue cultura de micro-organismos, solventes ou reagentes nas pias. Eles contaminam/poluem o ambiente e solventes inflamáveis na tubulação de esgoto podem levar a sérias explosões. Despeje solventes em frascos apropriados. Em caso de dúvida, consulte o professor sobre o método adequado de descarte.
- 42. Não jogue vidro quebrado ou lixo de qualquer espécie nas caixas de areia.
- 43. Certifique-se que saiba usar o microscópio. Nunca coloque a objetiva de 100X diretamente sobre o material. Essa pode ser usada somente quando for adicionado óleo de imersão antes de posicioná-la. Sempre que utilizar a objetiva de 100X, e portanto o óleo de imersão, certifique-se que esta foi limpa. A permanência deste por longos períodos pode danificar o microscópio.
- 44. Ao se retirar do laboratório, lave sempre as mãos.

Os acidentes

- 45. Em caso de acidente, procure imediatamente o professor, mesmo que não haja danos pessoais ou materiais.
- 46. Todo acidente, por menor que pareça, e qualquer contacto com reagentes químicos ou microbiológicos devem ser comunicado ao professor.
- 47. Caindo produto químico ou microbiológico nos olhos, na boca ou na pele, lave **abundantemente** com água a parte atingida. A seguir, avise o professor e procure o tratamento específico para cada caso.
- 48. Vidros quebrados devem ser descartados, depois de **limpos**, em depósitos para lixo de vidro. Nunca jogue vidros quebrados no lixo comum, onde podem causar cortes no pessoal de limpeza.
- 49. Em caso de derramamento de mercúrio, chame imediatamente o professor ou o técnico. Vapores de mercúrio são muito tóxicos.

DECLARAÇÃO

DECLARO, QUE LI ATENTAMENTE O DOCUMENTO **“NOÇÕES ELEMENTARES DE SEGURANÇA PARA OS LABORATÓRIOS DIDÁTICOS DE MICROBIOLOGIA DA DISCIPLINA BMM-271-NOTURNO- ICB-USP”**.

COMPROMETO-ME A SEGUIR, INCONDICIONALMENTE, AS RECOMENDAÇÕES DO DOCUMENTO ACIMA E APRESENTAR-ME PARA QUALQUER ATIVIDADE DENTRO DOS RECINTOS LABORATORIAIS DESTE INSTITUTO, OBSERVANDO RIGOROSAMENTE TODOS OS ITENS DO DOCUMENTO ACIMA.

EM CASO DA NÃO OBSERVÂNCIA DOS ITENS **06, 07, 08 e 13** DO REFERIDO DOCUMENTO, ENTENDO QUE NÃO PODEREI PERMANECER NO RECINTO DOS EXPERIMENTOS.

NOME LEGÍVEL: _____

CÓDIGO USP: _____

E-MAIL: _____

São Paulo, ____ de _____ de _____.

ASSINATURA

PRÁTICA 1

MORFOLOGIA E CITOLOGIA BACTERIANA

Profa. Dra. Rita de Cássia Café Ferreira

Prof. Dr. Márcio Dias

1. Material: lâminas com esfregaços de diferentes espécimes, já coradas, e óleo de imersão.
2. Observação ao microscópio ótico, **objetiva de 100X**.
 - 2a. Depositar uma gota de óleo de imersão no centro do esfregaço corado
 - 2b. Colocar a lâmina no microscópio
 - 2c. Imergir a lente da objetiva de imersão (100X) no óleo, até encostá-la na lâmina
 - 2d. Levantar ao máximo o condensador e abrir totalmente o diafragma
 - 2e. Focalizar com o macrométrico até notar o campo e, a seguir, aperfeiçoar o foco com o micrométrico
 - 2f. Terminada a observação, retirar a lâmina
 - 2g. **Limpar a objetiva com lenço de papel e desligar o microscópio**
3. Observação das formas bacterianas, arranjos e estruturas:
 - 3a. Cocos Gram-positivos em cadeias (estreptococos)
 - 3b. Cocos Gram-positivos em cachos (estafilococos)
 - 3c. Bacilos Gram-positivos
 - 3d. Cocobacilos Gram-negativos
 - 3e. Cocos Gram-negativos (*Neisseria gonorrhoeae*) em secreção uretral
 - 3f. Esporos (coloração de Wirtz)
 - 3g. Espiralados (técnica de Fontana-Tribondeau, impregnação com sais de prata)
 - 3h. Cápsula (coloração negativa da cápsula)
4. Desenhar a morfologia, arranjo e coloração das bactérias focalizadas e suas estruturas.
5. Qual o aumento final das bactérias observadas?

PRÁTICA 2

TÉCNICAS DE SEMEADURA E ISOLAMENTO BACTERIANO

Profa. Dra. Rita de Cássia Café Ferreira

Prof. Dr. Márcio Dias

Meios de cultura

As bactérias exigem determinados nutrientes para que possam se multiplicar. Para síntese de seus próprios constituintes devem dispor de fonte de carbono (açúcares), nitrogênio (peptonas), sais orgânicos, vitaminas e outros fatores de crescimento.

1.Meios básicos de cultura:

- a. Caldo simples: constituído basicamente de extrato de carne e peptona.
- b. Agar simples: adiciona-se ágar ao caldo simples. O ágar é um polissacarídeo extraído de algas marinhas, que não é metabolizado por bactérias, com a finalidade de endurecer o meio de cultura líquido.

2.Classificação dos meios de cultura:

a.quanto à consistência:

- meios líquidos**: utilizados para crescimento de microrganismos, em culturas puras.
- **meios sólidos** em placa de Petri: para obtenção de colônias isoladas, antibiograma, assimilação de açúcares.
- meios semi-sólidos** em tubos: para verificar mobilidade e fermentação de açúcares.

b. quanto à função:

- meios simples**: possuem os componentes essenciais para o crescimento de microrganismos pouco exigentes. Ex.: caldo simples.
- meios enriquecidos**: meios simples acrescidos de substâncias de enriquecimento, tais como sangue de animais, soro, ovo, extrato de cérebro, açúcares, extrato de levedura, extrato de soja entre outros. Ex.: ágar sangue.
- **meios seletivos**: meios que favorecem o desenvolvimento de determinados microrganismos, mas inibem a proliferação de outros, devido à adição de substâncias inibidoras, determinados nutrientes, pH, pressão osmótica, etc. Ex. de substâncias seletivas:
 - ♦ novobiocina: inibe *Proteus* spp.
 - ♦ sais biliares: em altas concentrações (8,5%) inibem Gram-positivos e esporulados.
 - ♦ azida sódica: inibe fungos.
 - ♦ bacitracina: inibe espécies de *Streptococcus*, com exceção de *Streptococcus mutans*.
 - ♦ cristal violeta (em certas concentrações): inibe Gram-positivos.
 - ♦ telurito de potássio: favorece crescimento de Gram-positivos (Ex. *Streptococcus*)

Exemplo de meio seletivo: Mitis-salivarius bacitracina (MSB) acrescido de sacarose. Este meio inibe consideravelmente o crescimento de várias espécies de *Streptococcus* enquanto que *S. mutans* cresce com facilidade.

- **meios seletivos diferenciais:** utilizados para isolamento e identificação presuntiva de bactérias. Permitem o desenvolvimento de grupos de microrganismos com características definidas, que os diferenciam dos demais grupos. Estas características geralmente podem ser evidenciadas através de formas ou cores das colônias ou coloração do meio ao redor das mesmas. Ex.: Agar MacConkey. Neste meio, que contém lactose e vermelho neutro (indicador de pH), *Escherichia coli* e *Enterobacteraerogenes* fermentam a lactose com produção de ácidos, o que diminui o pH, produzindo colônias de coloração rosa ou vermelho, enquanto *Proteusspp*, *Shigella spp.* e *Salmonella spp.* (não fermentam a lactose), apresentam colônias incolores ou brancas. Este meio contém ainda sais biliares e cristal violeta.

TÉCNICAS DE ISOLAMENTO

Para determinar a espécie bacteriana presente em uma amostra clínica, é importante isolar o microrganismo em cultura pura, para posterior diagnóstico de uma doença, para teste de sensibilidade a antibióticos, preparo de vacinas, etc.

Serão utilizadas duas técnicas: o **método de esgotamento por estrias** e o método de diluições e **semeadura em superfície de meio de cultura com alça de Drigalsky**.

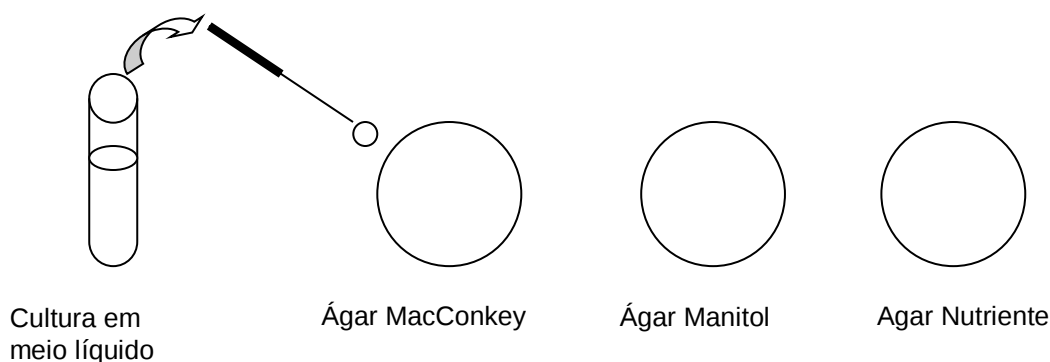
Exercício1:

Objetivo: isolar as amostras bacterianas de uma cultura, em meio líquido, através da técnica de esgotamento por estrias.

Material: 3 placas de Petri

1 tubo com cultura de *E. coli* ou 1 tubo com cultura de *S. aureus*.

Semear cada tubo nos três meios de cultura.



- Observar:

1. Quantidade de colônias em cada campo
2. Distribuição nos "3 campos"
3. Aspectos morfológicos das colônias

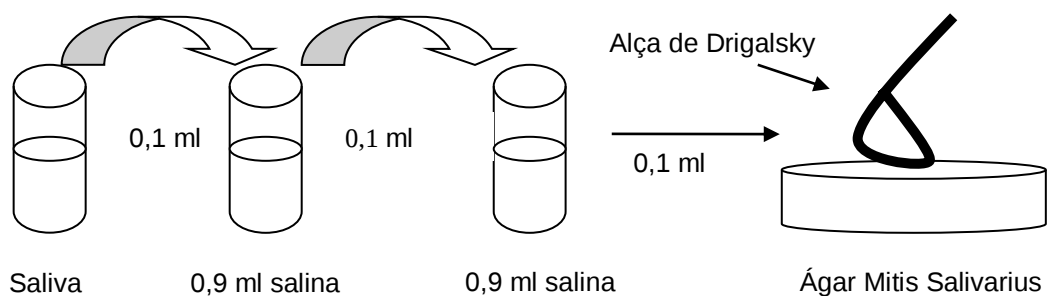
4. Características tintoriais: coloração de Gram de cada tipo de colônia.

Complete a tabela e explique os resultados obtidos em cada meio de cultura

Resultados	Semeadura em estria								
	MacConkey			Manitol			AN		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
No. de colônias									
Aspecto e morfologia das colônias									
Gram (aspecto versus coloração)									

Exercício 2:

Objetivo: obtenção de crescimento bacteriano homogêneo em superfície de meio sólido através da utilização de alça de Drigalsky, após diluições do espécime clínico (Ex.: saliva).



Observar:

- distribuição homogênea de crescimento
- aspecto das colônias

PRÁTICA 3

TÉCNICA DE COLORAÇÃO DE GRAM

Profa. Dra. Rita de Cássia Café Ferreira

Prof. Dr. Márcio Dias

Material necessário:

1. Cultura de bactérias na forma de cocos e cultura de bacilos em meio líquido ou em meio sólido.
2. Lâminas para microscopia
3. Alça de platina
4. Tubo contendo solução salina esterilizada
5. Bateria para coloração de Gram
6. Microscópio, suporte para lâminas.

Procedimentos:

- Identificar as lâminas
- Aquecer a alça bacteriológica ao rubro e, a seguir, deixá-la esfriar, conservando-a próxima ao fogo.
- Remover o material a ser analisado, sem contaminar.
- Depositar sobre a lâmina a suspensão bacteriana e espalhar.
- Deixar o esfregaço secar naturalmente, nas proximidades do fogo.
- Fixar o esfregaço pelo calor e esperar a lâmina esfriar antes de realizar a coloração.
- Cobrir o esfregaço com **violeta de genciana**, esperar um minuto, lavar com água.
- Colocar **lugol**, esperar um minuto, lavar novamente com água. **O lugol é uma solução aquosa de iodo a 1% mais iodeto de potássio a 2%.**
- Diferenciar com **álcool** até não se observar mais a saída de corante, lavar com água.
- Cobrir com **fucsina**, esperar 20 segundos e lavar com água. Secar a lâmina e observar ao microscópio.
- Anotar os resultados obtidos.
- Limpar as objetivas do microscópio e desligá-lo.

Coloração de Gram

A coloração de Gram foi desenvolvida em 1884 pelo bacteriologista holandês Hans Christian Gram. Esta coloração é uma das mais importantes e é rotineiramente utilizada no laboratório de Microbiologia. Ela divide as bactérias em dois grandes grupos: GRAM POSITIVAS e GRAM-NEGATIVAS, além de permitir o estudo da célula bacteriana quanto à sua morfologia (cocos ou bacilos) e arranjo.

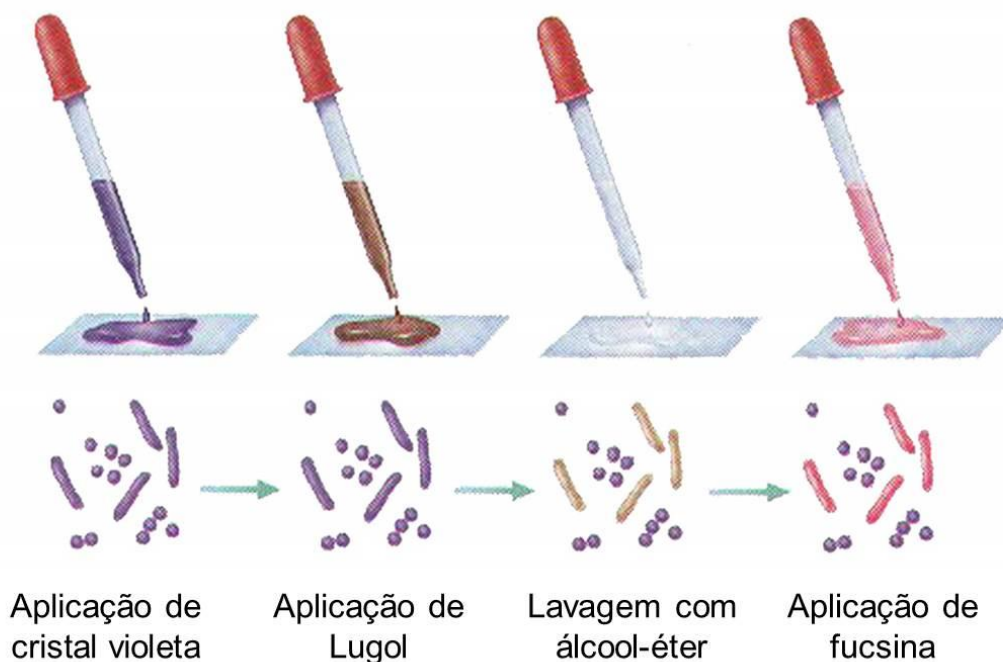
As bactérias capazes de reter o complexo formado pelo cristal violeta (CV) mais o lugol, formando o complexo iodo pararosanilina, coram-se em violeta (Gram-positivo), enquanto que as que não retêm o complexo, após aplicação do álcool, coram-se em vermelho (Gram-negativo), pela fucsina.

A coloração de Gram é uma coloração diferencial porque não cora todos os tipos de células igualmente. Essa maneira de reagir diferentemente, frente ao Gram, é em razão das diferenças na estrutura da parede celular das bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Bactérias gram-positivas possuem uma camada de peptidoglicano mais espessa que as gram-negativas. Quando aplicado em células gram-positivas e gram-negativas o cristal violeta (CV) e o lugol penetram facilmente, e dentro das células (citoplasma) combinam-se formando o complexo CV-iodo.

Nas células gram-negativas o álcool remove lipídios da membrana externa celular, penetra pela fina camada de peptidoglicano e o complexo iodo-pararosanilina é removido do citoplasma. Estas células são então contracoradas pelo segundo corante, a fucsina, e aparecem vermelhas.

Técnica de Coloração de Gram



Questão: nas culturas em meio líquido os bacilos são _____ e os cocos são _____.

PRÁTICA 4

ANTIBIOGRAMA

Profa. Dra. Rita Café Ferreira

Prof. Dr. Márcio Dias

O antibiograma é um teste que permite a verificação “in vivo” da sensibilidade de uma bactéria aos antibióticos. Esta sensibilidade é demonstrada pela zona ou halo de inibição de crescimento que se forma em volta do disco de antibiótico. De acordo com o DIÂMETRO do halo de inibição diz-se que a bactéria é sensível ou resistente.

Método de Difusão em ÁGAR (Método de Kirby-Bauer)

Material:

- Cultura bacteriana crescida por 18 horas (10^5 células por mL);
- Placas com meio de cultura Müller-Hinton;
- Discos de antibióticos. Poderão ser utilizados antimicrobianos diferentes do que estão na tabela de interpretação de resultados, mediante ao estoque no almoxarifado e também para um aumento de testes de mecanismo de ação;
- Cotonetes e pinças esterilizadas.

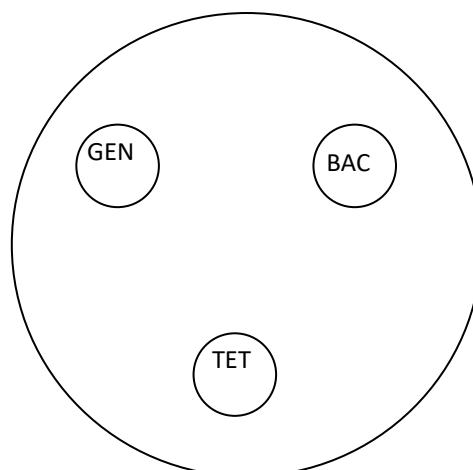
Procedimento:

1. Agitar bem a cultura bacteriana (*Escherichia coli* ou *Staphylococcus aureus*);
2. Umedecer o cotonete na suspensão bacteriana, retirando o excesso ao apertar o cotonete contra a parede interna do tubo;
3. Espalhar a suspensão bacteriana em toda a superfície do meio de cultura, de modo homogêneo, inclusive nas bordas;
4. Colocar os discos de antibióticos com auxílio da pinça sobre a superfície do meio e de modo eqüidistante (ver figura);
5. Incubar as placas a 37°C por 18 horas.

Gentamicina (GEN)

Tetraciclina (TET)

Bacitracina (BAC)



Resultados

Leitura e interpretação: Verificar a presença ou ausência de halo de inibição ao redor dos discos. Medir o DIÂMETRO dos halos (em milímetros) e verificar nas tabelas o resultado obtido.

Interpretação de halos de inibição

Antibiótico	concentração	sigla	resistente	intermediário	sensível
Cefalotina	30µg	CFL	14 ou –	15 a 17	18 ou +
Kanamicina	30µg	KAN	13 ou -	14 a 17	18 ou +
Norfloxaxina	10µg	NOR	12 ou -	13 a 16	17 ou +
Polimixina B	300UI	POL	8 ou -	9 a 11	12 ou +
Rifampicina	5µg	RIF	24 ou -	-	25 ou +
Vancomicina	30µg	VAN	9 ou -	10 ou 11	12 ou +

Completar de acordo com os resultados obtidos por toda a turma

Grupo	Bactéria	CFL	KAN	NOR	POL	RIF	VAN
Esperado	<i>E. coli</i>						
Esperado	<i>S. aureus</i>						
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							

TABELA I

Tabela para interpretação de halos de inibição (*) antibacterianos para organismos Gram positivos e negativos

Antibacterianos	Conc. Discos	Código	Zona de Inibição em mm			
			Resistente	(a) intermediário	(a) Moder. sensível	Sensível
Amicacina (b)	30 µg	AMI	≤ 14	15 - 16	-	≥ 17
Ampicilina (c)						
- p/ Gram negativos entéricos	10 µg	AMP	≤ 11	12 - 13	-	≥ 14
- p/ Staphylococcus (d)	10 µg	AMP	≤ 28	-	-	≥ 29
- p/ Haemophilus sp (e)	10 µg	AMP	≤ 19	-	-	≥ 20
- p/ enterococos (f,g)	10 µg	AMP	≤ 16	-	≥ 17 (g)	-
p/ estreptococos não enterococos (f,g)	10 µg	AMP	≤ 21	-	22 - 29	≥ 30
Carbenicilina						
- p/ Enterobactérias (d)	100 µg	CAR	≤ 17	18 - 22	-	≥ 23
- p/ Pseudomonas	100 µg	CAR	≤ 13	14 - 16	-	≥ 17
Cefazolina (h)	30 µg	CFZ	≤ 14	15 - 17	-	≥ 18
Cefotaxima (h)	30 µg	CTX	≤ 14	-	15 - 22	≥ 23
Cefoxitina (h)	30 µg	CFO	≤ 14	15 - 17	-	≥ 18
Cefalotina (h)	30 µg	CFL	≤ 14	15 - 17	-	≥ 18
Cefoperazona (h)	75 µg	CPZ	≤ 15	16 - 20	-	≥ 18
Ceftazidima (h)	30 µg	CTZ	≤ 14	15 - 17	-	≥ 18
Cefuroxima (h)	30 µg	CRX	≤ 14	15 - 17	-	≥ 18
Cloranfenicol	30 µg	CLO	≤ 12	13 - 17	-	≥ 18
Clindamicina (j)	2 µg	CLI	≤ 14	15 - 16	-	≥ 17
Doxiciclina (l)	30 µg	DOX	≤ 12	13 - 15	-	≥ 16
Eritromicina	15 µg	ERI	≤ 13	14 - 17	-	≥ 18
Estreptomicina	10 µg	EST	≤ 11	12 - 14	-	≥ 15
Gentamicina (b)	10 µg	GEN	≤ 12	13 - 14	-	≥ 15
Minociclina (l)	30 µg	MIN	≤ 14	15 - 18	-	≥ 19
Nalidixico. Ac (i)	30 µg	NAL	≤ 13	14 - 18	-	≥ 19
Netilmicina (b)	30 µg	NET	≤ 12	13 - 14	-	≥ 15
Nitrofurantoina(i)	300 µg	NIT	≤ 14	15 - 18	-	≥ 17
Oxaciclina						
- p/ Staphylococcus (m)	1 µg	OXA	≤ 10	11 - 12	-	≥ 13
- p/ pneumococcus penicilina sensível (e)	1 µg	OXA	≤ 19	-	-	≥ 20
Penicilina G						
- p/ Staphylococcus (d)	10 UI	PEN	≤ 28	-	-	≥ 29
- p/ N. gonorrhoeas	10 UI	PEN	≤ 19	-	-	≥ 20
- p/ enterococos (f,g)	10 UI	PEN	≤ 14	-	≥ 15 (g)	-
- outros Gram positivos (f,g)	10 UI	PEN	≤ 19	-	20 - 27	≥ 28
Sulfonamidas (i,n)	300 µg	SUL	≤ 12	13 - 16	-	≥ 17
Tetraciclina (l)	30 µg	TET	≤ 14	15 - 18	-	≥ 19
Trimetoprima (i,n)	5 µg	TRI	≤ 10	11 - 15	-	≥ 16
Sulfametoxazol / Trimetoprima	25 µg	SUT	≤ 10	11 - 15	-	≥ 16
Tobramicina (b)	10 µg	TOB	≤ 12	13 - 14	-	≥ 15
Vancomicina	30 µg	VAN	≤ 9	10 - 11	-	≥ 12

(*) Adaptado do NCCLS - (a, b, c,....) ver bula Cefar

TABELA COMPLEMENTAR II

Tabela padrão para interpretação de halos de inibição de antibacterianos não tabulados em I

Antibacterianos	Conc. Discos	Código	Zona de Inibição em mm			
			Resistente	(a) intermediário	(a) Moder. sensível	Sensível
Amoxicilina	10 µg	AMO	segue Ampicilina			
Bacitracina	10 UI	BAC	≤ 8	9 - 12	-	≥ 13
Cefalexina	30 µg	CEF	≤ 14	15 - 17	-	≥ 18
Cefaloridina	30 µg	CFA	≤ 14	15 - 17	-	≥ 18
Cefadroxil	30 µg	CFD	≤ 14	15 - 17	-	≥ 18
Cefapirina	30 µg	CFP	≤ 14	15 - 17	-	≥ 18
Cefradina	30 µg	CFI	≤ 14	15 - 17	-	≥ 18
Ceftriaxona	30 µg	CRO	≤ 13	14 - 17	-	≥ 18
Ciprofloxacina	5 µg	CIP	≤ 15	16 - 20	-	≥ 21
Cotrimazina						
Sulfadiazina + Trimetoprima	25 µg	SZT	≤ 10	11 - 15	-	≥ 16
Didoxacilina	1 µg	DIC	segue Oxacilina			
Fosfomicina	20 µg	FOS	≤ 11	12 - 17	-	≥ 18
Lincomicina	2 µg	LIN	≤ 14	15 - 16	-	≥ 17
Neomicina	30 µg	NEO	≤ 12	13 - 16	-	≥ 17
Norfloxacina (**)	10 µg	NOR	≤ 12	13 - 16	-	≥ 17
Pefloxacina (**)	5 µg	PEF	≤ 16	17 - 21	-	≥ 22
Pipemidico, Ac. (**)	20 µg	PIP	≤ 13	14 - 18	-	≥ 19
Polimixina - B	300 UI	POL	≤ 8	9 - 11	-	≥ 12
Rifamicina - B	30 µg	RFM	≤ 33	-	-	≥ 34
Rifampicina (**)						
- p/ N. meningitidis	5 µg	RIF	≤ 24	-	-	≥ 25
- p/ outros organismos	30 µg	RIF	≤ 11	12 - 18	-	≥ 19
Rifampicina / Trimetoprima (**)	35 µg	RIT	≤ 11	12 - 14	-	≥ 15
Sisomicina	10 µg	SIS	≤ 14	15 - 17	-	≥ 18
Tianfenicol	30 µg	TIA	≤ 12	13 - 17	-	≥ 18

REFERÊNCIAS:

- 1 - Bauer, A. W.; Kirby, W. M. M.; Sherris, J. C. and Turck, M. - Antibiotic susceptibility testing by standardized single disc method. Amer. J. Clin. Path. 45: 493 - 6. 1966.
- 2 - Federal Register. col. 37, nº 191, September 30. 1972.
- 3 - NCCLS (National Commithes for Clinical Laboratory Standards). Oct. 1983. Performance Standard for Antimicrobial Disc Susceptibility Test. Vol. 3. nº 14.
- 4 - Ximenes, J. Importância da padronização da prova de sensibilidade bacteriana (Antibiograma). A Folha Médica vol. 66. nº 3, p. 113 - 116. 1973.

(**) Limites fornecidos pelo laboratório detentor do antibacteriano.

PRÁTICA 5

CONTROLE DO CRESCIMENTO BACTERIANO POR AGENTES FÍSICOS E QUÍMICOS

Profa. Dra. Rita Café Ferreira

Prof. Dr. Márcio Dias

I. Ação de agentes químicos

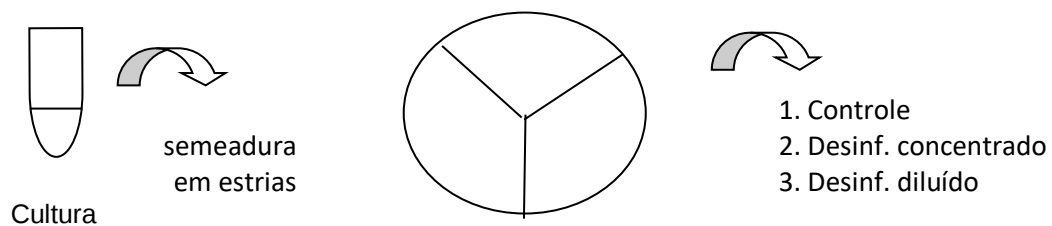
1.1. Desinfetantes comerciais

Material recebido:

- 2 tubos com *Escherichia coli* ou *Bacillus subtilis*;
- 1 placa de Agar Nutriente divididas em 3 partes;
- Desinfetante comercial (concentrado e diluído).

Procedimento :

- Transferir uma alçada de cada tubo para a área Controle da placa de Petri;
- Transferir 0,5 ml do desinfetante testado (concentrado e diluído) para o respectivo tubo contendo 0,5 ml de cultura bacteriana;
- Homogeneizar os tubos e aguardar 10 minutos;
- Transferir uma alçada de cada tubo para respectiva área da placa de Petri;
- Identificar as placas semeadas e incubar.



RESULTADOS:

Espécie bacteriana	Controle	Concentrado	Diluído
<i>Escherichia coli</i>			
<i>Bacillus subtilis</i>			

1.2. Antissepsia das mãos

1.1. Dividir o fundo da placa de Petri contendo meio de cultura em **3** partes iguais.

1.2. Com um cotonete esterilizado e umedecido em solução salina estéril, esfregar sobre a palma da mão e em seguida, semear o terço identificado da placa.

1.3. Lavar as mãos com detergente, vigorosamente, em todas as superfícies, durante 1 minuto, não secar com papel toalha! Em seguida realize o procedimento 1.2.

1.4. Aplicar, nas mãos pré-lavadas, álcool 70% durante 1 minuto. A seguir, realize novamente o procedimento 1.2.

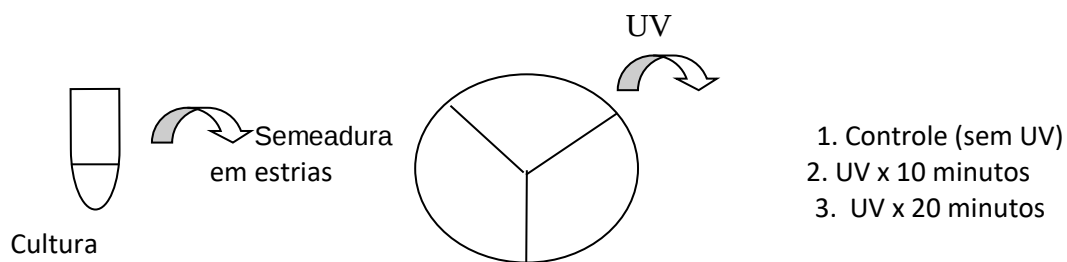
- As placas serão incubadas a 37° C x 24 horas.

RESULTADOS:

	Crescimento	Gram
Mãos sem lavar		
Mãos Lavadas		
Antissepsia com álcool 70%		

II. Ação de Agentes Físicos

2.1. Ação da luz Ultravioleta (UV) - Aula Demonstrativa

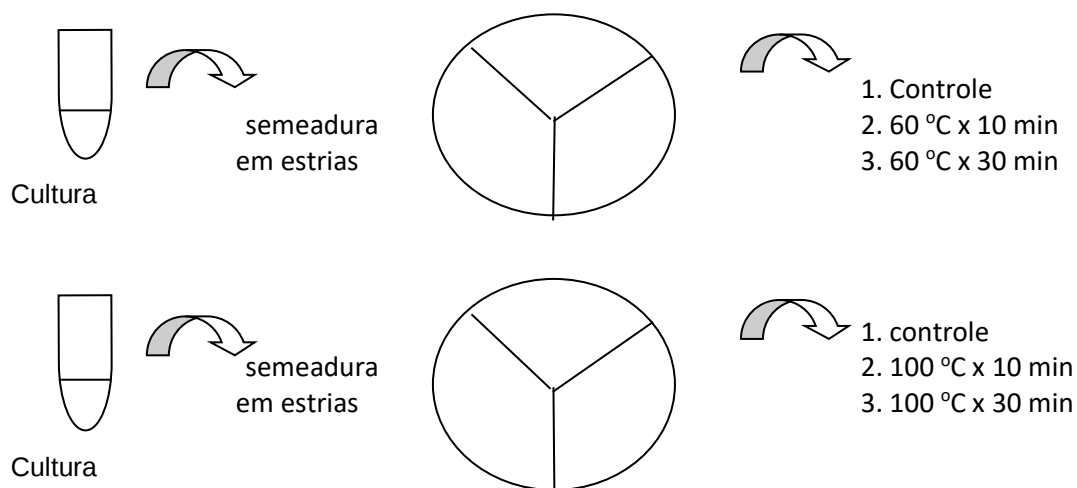


Incubação: as placas permanecerão embrulhadas em papel por 24 horas a 37 °C.

RESULTADOS:

	<i>E. coli</i>	<i>Bacillus</i>
Controle		
U.V. x 10 min		
U.V. x 20 min.		

2.2. Ação do calor - Aula Demonstrativa



Incubação: as placas permanecerão por 24 horas a 37 °C.

RESULTADOS:

	<i>E. coli</i>	<i>Bacillus</i>
Controle		
60° C x 10 min		
60° C x 30 min.		
100° C x 10 min.		
100° C x 30 min		