

**Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas**

ROTEIRO DE AULAS PRÁTICAS

BMM 400- MICROBIOLOGIA BÁSICA – Enfermagem

2019

Normas de Segurança

1. Sobre **Biossegurança**: ações voltadas para a prevenção e eliminação de riscos inerentes às atividades desenvolvidas no laboratório, que possam comprometer a saúde humana, de animais; contaminar o meio ambiente, ou a qualidade dos trabalhos desenvolvidos.
2. É **INDISPENSÁVEL** o uso de avental no laboratório. O avental deve ser, de preferência, comprido, com mangas compridas e estar abotoado.
3. É **PROIBIDO** ingerir alimentos, beber ou fumar no laboratório.
4. Utilizar na bancada somente o material necessário ao trabalho prático, como: roteiro de aula, papel ou caderno para anotação e caneta. Material extra deixar nas prateleiras abaixo das bancadas.
5. Em caso de qualquer acidente (derramamento de culturas, quebra de placas, ferimentos, respingo de cultura, etc.) comunicar **IMEDIATAMENTE** o professor ou o pessoal técnico responsável pela aula prática.
6. Descarte do material:
 - materiais contaminados devem ser colocados nos recipientes próprios existentes nos laboratórios.
 - placas de Petri utilizadas deverão ser deixadas **TAMPADAS** sobre a bancada.
 - lâminas fornecidas pelos professores para visualização deverão ser deixadas sobre a bancada, tubos com culturas deverão ser deixados nas estantes.
7. Prestar atenção às atividades dos colegas ao lado, para evitar que materiais incompatíveis sejam manipulados ao mesmo tempo. Exemplo: álcool e fogo.
8. Terminados os trabalhos práticos:
 - flambar alças e fios de platina;
 - verificar se as torneiras de água e gás estão fechadas;
 - desligar lâmpadas e microscópios;
 - limpar os microscópios e cobri-los com a capa;
 - tirar o avental e guardar;
 - lavar cuidadosamente as mãos com água e desinfetante.
9. **Risco Biológico**: significa a probabilidade de perigo, geralmente com ameaça física para o homem ou para o meio ambiente. Os microrganismos são classificados em quatro categorias de acordo com o grau de risco:

Categoria 1: Baixo risco individual e para a coletividade. Microrganismos raramente patogênicos em humanos

Categoria 2: Moderado risco individual e limitado risco para a comunidade. Pode apresentar risco para os laboratoristas, mas é de difícil disseminação para a comunidade.

Categoria 3: Alto risco individual e moderado risco para a comunidade

Categoria 4: Alto risco individual e para a comunidade.

Equipamentos de proteção individual (**EPIs**) e equipamentos de proteção coletiva (**EPCs**) devem ser utilizados no tratamento de microrganismos.

Incluem EPIs: Luvas, avental, óculos de proteção, protetor facial, máscara, sapatilha, dosímetros para radiação ionizante...

EPCs → cabines de segurança biológica, capela química, chuveiro de emergência, lava olhos, bico de bunsen...

ROTEIRO DE AULAS PRÁTICAS

BMM 400- MICROBIOLOGIA BÁSICA – Enfermagem

PRÁTICA: TRANSMISSÃO DE MICRORGANISMOS POR CONTATO.

A palavra contágio se origina da palavra latina *contagium*, que significa toque ou contato, portanto podemos dizer que doenças contagiosas são aquelas que podem ser transmitidas por contato direto: pessoa-pessoa, por água, ar ou alimentos. Apertos de mãos e beijos são exemplos de contatos diretos que podem transmitir microrganismos patogênicos (poliomielite, varicela e infecções estreptocócicas).

O contato direto com lesões infectadas (feridas abertas, e abscessos), obviamente é um caminho em potencial para adquirir e transmitir os agentes infecciosos. Certamente, o ato de lavar as mãos após assoar o nariz, defecar, urinar ou manipular pessoas infectadas, ou objetos contaminados com material biológico, contribui para impedir a disseminação de agentes infecciosos. Em ambiente hospitalar, a lavagem das mãos antes e após a manipulação de pacientes é uma atitude extremamente necessária para evitar infecções hospitalares.

Material aula prática:

1. 10 g de fermento biológico.
2. Erlenmeyer contendo 100 ml água destilada estéril.
3. Zaragatoas estéreis.
4. Placa contendo ágar Sabouraud dextrose.

Método:

1. Dividir (visualmente, com uma caneta) o fundo das placas de ágar Sabouraud em 4 partes iguais. Cada parte será usada para semear material colhido de um aluno.
2. Acrescentar 5g de fermento biológico (*Saccharomyces cerevisiae*) em 45 ml de água destilada estéril.
3. Derramar a suspensão de fermento nas mãos do aluno nº 1 e ele deverá espalhar a suspensão entre as palmas das mãos.
4. O aluno nº 1 deverá apertar a mão de outro colega (vizinho imediato). O aluno nº 2, por sua vez, aperta a mão do seu vizinho e transmite o microrganismo. O experimento segue assim, com apertos de mãos sucessivos até completar uma cadeia epidemiológica composta por até 8 componentes.
5. Logo após o aperto de mãos, um componente do grupo, com as mãos limpas, colhe material das mãos contaminadas; para tal deve umedecer uma zaragatoa em solução fisiológica estéril, esfregar na palma da mão contaminada e semear os microrganismos nos respectivos quadrantes da placa de Agar Sabouraud.
6. Alguns grupos podem quebrar a cadeia de transmissão por lavagem das mãos com água e sabonete (4º ou 5º aluno).
7. Outro grupo pode introduzir um objeto da cadeia de transmissão, exemplo uma caneta, e passar esta ao colega seguinte.
8. Incubar as placas identificadas na estufa a 25°C até a aula seguinte.

Resultado:

Contar o número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) observadas em cada quadrante das placas e anotar no quadro abaixo.

	1 ^o	2 ^o	3 ^o	4 ^o	5 ^o	6 ^o	7 ^o	8 ^o
Quadrantes								
UFC								

QUESTÕES PARA ESTUDO

- 1). Como deve ser a contagem de colônias de *S. cerevisiae* em uma cadeia de contaminação contínua?
- 2). Se o indivíduo de número 4 lavar a mão antes de contaminar o indivíduo seguinte como deve se apresentar a cadeia?

PRÁTICA: ISOLAMENTO DE FUNGOS E BACTÉRIAS DO CORPO HUMANO

1) Introdução:

Estima-se que o corpo humano adulto seja o hospedeiro de pelo menos 100 trilhões de microrganismos. Grande parte da **microbiota normal do corpo humano** é composta de bactérias e fungos. As espécies e as quantidades de microrganismos que compõem a microbiota normal variam de acordo com o local analisado (pele, boca, nasofaringe, ouvido, trato intestinal e trato urogenital inferior), a idade e as condições físicas do hospedeiro. A microbiota normal pode ser dividida em dois grupos: **microbiota residente**, inofensiva e benéfica ao hospedeiro e **microbiota transitória**, composta por microrganismos inofensivos ou potencialmente patogênicos. Muitos locais do corpo humano se encontram completamente livres de microrganismos (fluido cefalorraquidiano, sangue, bexiga, útero, trompas de falópio, ouvido médio, seios paranasais e rins) e a presença de microrganismos nestes locais é sinônimo de infecção.

PELE:

Staphylococcus epidermidis (90%)
Staphylococcus aureus (10-40%)
Neisserias
Propionibacterium acnes
Corynebacterium xerosis,
Pityrosporum spp (fungo)
Candida spp. (levedura)

OLHOS - CONJUNTIVA:

Staphylococcus epidermidis
Staphylococcus aureus
Corynebacterium sp

NARIZ:

Staphylococcus epidermidis
Staphylococcus aureus
Corynebacterium sp
Neisserias

BOCA:

Staphylococcus epidermidis
Staphylococcus aureus
Streptococcus
Corynebacterium sp
Lactobacillus
Actinomyces
Treponema sp
Candida sp

NASOFARINGE:

Semelhante à boca, mas pode ter ainda:
Haemophilus sp
Neisserias
Streptococcus pneumoniae

BOCA – DENTES:

Streptococcus mutans
Streptococcus salivarius

INTESTINO:

Duodeno-jejuno (10^3 bact/ml):

Staphylococcus sp
Lactobacillus sp

Jejuno inferior e íleo (10^6 - 10^8 bact/ml):

Cólon e ceco (10^8 a 10^{11} bact/g fezes):

Streptococcus
Peptostreptococcus
Peptococcus
Staphylococcus
Lactobacillus
Bifidobacterium
Proteus
Pseudomonas
Candida
Bacterioides
coliformes

UROGENITAL:

Corynebacterium
Staphylococcus epidermidis
Enterococcus
Lactobacillus
Bacterioides
Neisserias não patogênicas
Ureaplasma urealyticum
Gardnerella vaginalis
Candida albicans

2) Exercício:

2.1). Material:

1. Placa de ágar sangue.
2. Placa de ágar Sabouraud dextrose.
3. Alça de platina.
4. Zaragatoa estéril para o grupo que vai isolar material da orofaringe.
5. Dois tubos com solução fisiológica estéril.

2.2) Técnica de coleta e semeadura: explicação na aula prática com demonstração.

2.3) Sugestões para áreas de coleta: fossas nasais, boca, orofaringe, pele seca e pele úmida.

1. Origem do material: **garganta.**

- a) Introduzir o zaragatoa pela boca do paciente e colher o material, com a língua abaixada, fazendo simples e delicada raspagem.
- b) Semear na placa de ágar sangue esfregando o zaragatoa em um dos lados da placa. A seguir, com uma alça de platina estéril, espalhar o material, com a finalidade de se obter colônias isoladas.
- c) Rotular a placa.

2. Origem do material: **fossas nasais.**

- a) Molhar o zaragatoa na solução fisiológica e proceder com a coleta na região das fossas nasais.
- b) Semear na placa de ágar sangue esfregando o zaragatoa em um dos lados da placa. A seguir, com uma alça de platina estéril, espalhar o material, com a finalidade de se obter colônias isoladas.
- c) Rotular a placa.

3. Origem do material: **pele seca e úmida.**

- a) Molhar o zaragatoa na água e proceder com a coleta nas regiões indicadas.
- b) Semear na placa de ágar Sabouraud.
- c) Rotular as placas.

QUESTÕES PARA ESTUDO

1). Como se deu o crescimento de colônias bacterianas nas placas de agar sangue?

2). Os microrganismos isolados da microbiota humana também devem ser encontrados no ambiente? Justifique.

BACTERIOLOGIA

PRÁTICA: COLORAÇÃO DE GRAM

Morfologia e Estrutura da célula bacteriana. Visualização de bactérias ao Microscópio Óptico (Microscopia de imersão, 1000X).

A maioria dos microrganismos são “incolores” ao microscópio óptico. Para ficarem evidentes quanto a sua forma e eventual agrupamento devem estar corados. Existem inúmeros métodos para coloração. Antes de ser corado, o microrganismo deve ser fixado à lâmina. Para tanto, realiza-se a secagem por simples exposição ao ar e, em seguida, rápida passagem da lâmina pela chama de fogo (bico de Bunsen).

Os corantes são cromóforos e podem ser ácidos ou básicos, de acordo com sua carga (básicos têm a cor do seu íon positivo; ácidos têm a cor do seu íon negativo). A célula bacteriana é negativamente carregada, portanto atrai corantes básicos. Os corantes básicos mais comuns são: cristal violeta, azul de metileno, fucsina e safranina. Quanto aos tipos de coloração temos:

1) Colorações simples: Resulta na coloração indistinta das bactérias, facilitando a visualização da forma das células bacterianas. Ex. Coloração com Azul de metileno.

2) Colorações diferenciais: Alguns corantes expostos às células bacterianas, em determinada sequência, interagem diferentemente com as estruturas presentes nas diferentes bactérias, permitindo a diferenciação de grupos bacterianos.

Ex.: Coloração de Gram; Coloração de Ziehl-Neelsen (BAAR).

No processo de coloração podem ser usadas substâncias que intensificam a cor por serem capazes de aumentar a afinidade do corante com a molécula alvo. Essas substâncias são chamadas mordentes, e é o caso do iodo (presente no lugol), na coloração de Gram.

3) Colorações especiais: São aquelas utilizadas para corar e identificar partes ou estruturas específicas das bactérias, como: esporo, cápsula, flagelo, grânulos, e outras estruturas.

Ex.: Na Coloração de Fontana-Tribondeau emprega-se o espessamento de bactérias espiraladas com prata.

A COLORAÇÃO DE GRAM

A coloração de Gram foi desenvolvida em 1884, pelo bacteriologista dinamarquês Hans Christian Gram. Esta coloração continua entre as mais importantes na rotina do laboratório de Microbiologia. Ela permite dividir as bactérias em dois grupos: Gram-positivas e Gram-negativas. Possibilita, ainda, a visualização da morfologia da célula bacteriana (cocos ou 3 bacilos) e dos arranjos entre as células (isoladas, em cachos, em cadeias). As bactérias Gram-positivas possuem, na parede celular, uma camada de peptidoglicano mais espessa do que as bactérias Gram-negativas (Fig. 1).

Quando aplicado em células Gram-positivas e Gram-negativas, o corante cristal violeta (violeta de genciana) e o iodo (Lugol) penetram facilmente; porém, dentro das células eles se combinam para formar o complexo violeta-lugol (iodo-pararosanilina). Nas bactérias Gram positivas, por causa da maior quantidade de peptidoglicano, o complexo iodo-pararosanilina não é removido facilmente pelo tratamento com álcool e, assim, estas células mantêm a cor roxa. Nas células Gram-negativas, o álcool penetra a membrana externa e o complexo violeta-lugol é removido da camada fina de peptidoglicano. Estas células são, em seguida, coradas pelo segundo corante (corante de contraste ou de fundo), a Fucsina ou Safranina, adquirindo a coloração rosa.

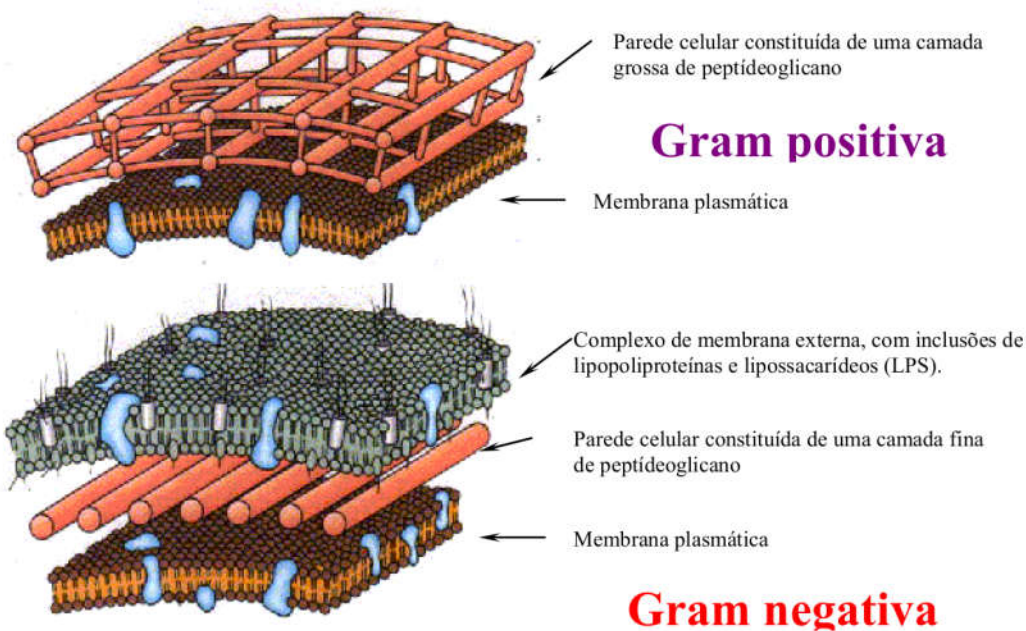


Fig. 1 – Estruturas típicas das paredes de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Assim, a Coloração de Gram é uma coloração diferencial. Esta coloração é o ponto de partida na identificação da maioria das bactérias de interesse médico. Para identificação final da bactéria, deverão ser realizadas provas bioquímicas e outras provas.

Procedimento:

A. Preparação e fixação do ESFREGAÇO (a partir de cultivos em meio líquido):

- 1). Flambar a alça ao rubro;
- 2). Esfriá-la nas paredes do tubo;
- 3). Introduzi-la na cultura para formar um “filme” na alça pela tensão superficial;
- 4). Depositar este material sobre uma lâmina limpa e seca;
- 5). Distribuir suavemente o material sobre a lâmina e obter um esfregaço fino;
- 6). Secar bem à temperatura ambiente.
- 7). Fixar o esfregaço: passar a lâmina 3 vezes sobre a chama do bico de Bunsen. (Para evitar que as bactérias sejam removidas da lâmina durante a coloração).

B. Técnica de Coloração de Gram:

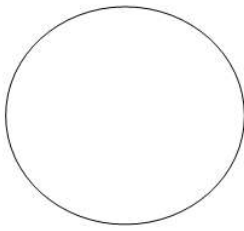
- 1). Cobrir o esfregaço com solução CRISTAL VIOLETA, incubar por 1 minuto;
- 2). Lavar rapidamente em água corrente;
- 3). Cobrir o esfregaço com solução LUGOL, e incubar por 1 minuto;
- 4). Lavar rapidamente em água corrente;
- 5). Lavar álcool por 15 segundos. Interromper logo o efeito do álcool lavando com água;
- 6). Cobrir o esfregaço com solução de FUCSINA básica, incubar por 30 segundos;
- 7). Lavar novamente em água corrente;
- 8). Secar a lâmina, pressionando-a levemente entre duas folhas de papel de filtro, com o cuidado para não remover o esfregaço corado;
- 9). Observar ao microscópio com objetiva de imersão (objetiva 100X).

Obs.: - Após a coloração, cuidado para não inverter face da lâmina com as bactérias.

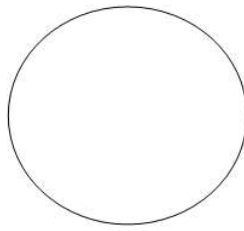
- O condensador do microscópio deve estar elevado.

A focalização deve ser realizada com cuidado e paciência, iniciando-se com aumento 10X.

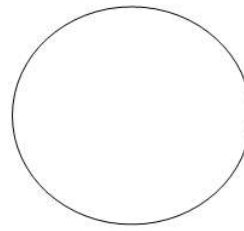
C. Observação e Anotação dos Resultados:



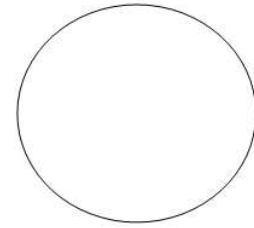
E. coli



Bacillus sp



Staphylococcus sp



Streptococcus sp

QUESTÕES PARA ESTUDO

1. Descreva a estrutura e composição das paredes das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.
2. Desenhe cada tipo de bactéria visualizada na aula prática.
3. Comente cada uma das etapas da coloração de Gram.

PRÁTICA - CONTROLE DAS POPULAÇÕES MICROBIANAS:

Introdução:

O bem-estar do homem e suas conveniências dependem em grande parte, do controle que ele exerce sobre os microrganismos. Isto é demonstrado em muitas de nossas atividades diárias, tais como purificação das águas, pasteurização de leite e refrigeração de alimentos. As principais razões para o emprego de métodos de controle dos microrganismos são: **prevenir a transmissão de doenças infecciosas; prevenir a deterioração de alimentos; e prevenir contaminação.**

A inibição ou destruição dos microrganismos pode ser feita por meio de agentes químicos ou físicos. Entre os agentes físicos mais frequentemente utilizados estão: as diferentes formas de calor, as baixas temperaturas e as radiações. Ainda poderíamos acrescentar a filtração de soluções, que embora não iniba ou mate os microrganismos, permite a remoção destes com consequente esterilização. Quanto aos agentes químicos, inúmeros são empregados, tais como: formol, fenol, óxido de etileno, entre outros.

No controle das populações microbianas, os antibióticos são considerados à parte e serão estudados nos exercícios práticos sobre antibiograma. Nos próximos exercícios serão estudados os agentes físicos e químicos. Quanto ao emprego, a diferença fundamental entre os antibióticos e os agentes químicos, reside no fato de que os primeiros podem ser introduzidos no organismo, desde que, em doses habituais, não causem danos à célula animal; enquanto que os agentes químicos são agressivos às células e só podem ser utilizados na desinfecção de instrumentos de superfícies ou na antisepsia da pele.

3.1- CONTROLE MICROBIOLÓGICO PELO CALOR

Material:

1. Cultura de *Escherichia coli* (bactéria não esporulada).
2. Cultura de *Bacillus subtilis* (bactéria esporulada).
3. Tubos contendo 1ml de solução salina estéril.
4. Placas de Petri contendo ágar nutriente.
5. Banho-maria a 60°C.
6. Alça de platina.

Metodologia 2 - Atividade de inibição do calor a 60°C:

1. Divida o fundo externo das placas de Petri em 4 partes iguais. Anote 0 no primeiro quadrante, 10 no segundo, 20 no terceiro e 30 no quarto quadrante.
3. Identifique o microrganismo nas duas placas.
4. Suspenda um pouco de crescimento de cada cultura em 1 ml de solução salina.
5. Introduza a alça de platina na suspensão de *E. coli*. Esgote-a na parede do tubo e semeie o primeiro quadrante da placa (0). O mesmo deve ser feito para *B. subtilis*.
6. A seguir, coloque ambos os tubos em banho-maria a 60°C. Aguarde 10 minutos, retire uma amostra de ambos os tubos e inocule no 2º quadrante.
7. Volte os tubos novamente ao banho-maria. Aguarde 10 minutos e inocule no 3º quadrante.
8. Volte os tubos ao banho-maria e aguarde 10 minutos. Inocule no 4º quadrante.
9. Incube as placas em estufa a 37°C por 24 horas.
10. Depois faça a leitura das placas, registrando a quantidade de crescimento em cada um dos quadrantes (de zero a quatro cruzes).

Resultados:

Metodologia de Tratamento		Contagem do número de colônias			
		0 min	10 min	20 min	30 min
<i>E. coli</i>	Banho-Maria 60°C				
<i>B. subtilis</i>					

3.2 - ANTISSEPSIA DA PELE - AÇÃO DA TINTURA DE IODO, MERTHIOLATE OU SABÃO NA DESINFECÇÃO DA PELE**Metodologia:**

1. Dividir o fundo externo da placa de Petri em duas partes iguais (antes – depois).
2. Umedecer um zaragatoa em solução salina e esfregar vigorosamente na pele das costas de uma das mãos, em uma área circular com aproximadamente 4 cm de diâmetro. Semear o material colhido com a zaragatoa na superfície de uma das metades da placa de Petri.
3. Umedecer uma gaze com tintura de iodo, merthiolate ou sabão e esfregar a pele da outra mão numa área circular com mesmo diâmetro que a primeira.
4. Esperar 4 min para que haja a ação do antisséptico e também para que esta área tratada seque por completo; passar então, nessa área, uma segunda zaragatoa umedecida com solução salina, tomando o cuidado para não atingir a área circundante à área desinfetada. Semear então a segunda metade da placa com esta zaragatoa.
5. Marcar na placa o tipo de antisséptico e o número do seu grupo de alunos.
6. Incubar a placa em estufa a 37°C por 24 horas.
7. Anotar os resultados na forma de cruzes.

Resultados:

Tratamento	Crescimento de colônias
Salina	
Tintura de iodo ou merthiolate	

3.3 - EFEITO DE DESINFETANTE SOBRE CULTURA BACTERIANA**Material:**

1. Tubo com 1,0 ml de cultura líquida de *Escherichia coli*.
2. Pipeta estéril de 5 ml.
3. Placa de Petri contendo meio sólido (NA ou TSA) (1 unidade).
4. Alça de Platina.

Metodologia:

1. Divida o fundo da placa de Petri em 3 partes. Anote em cada uma delas:

Antes, 1 minuto, e 5 minutos;
anote também o nome do microrganismo e o número do grupo.

2. Inocule uma alçada da suspensão bacteriana no espaço **Antes**.

3. Adicione 1,0 ml de desinfetante. Misture bem a cultura com o desinfetante e incube por **1 minuto**, à temperatura ambiente. Inocule uma alçada da mistura no espaço 1 minuto.

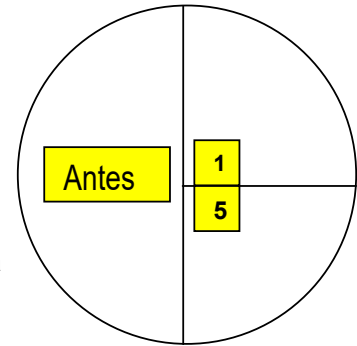
4. Incube a mistura bactéria-desinfetante por mais 4 minutos, à temperatura ambiente. Inocule uma alçada da mistura no espaço 5 minutos.

5. Incube as placas em estufa a 37°C, por 16 a 24 horas.

Resultados - Análise / Interpretação:

Contar e anotar o número de colônias de bactérias crescidas.

Caso seja impossível a contagem, anotar os resultados na forma de cruzes;



QUESTÕES PARA ESTUDO

- 1) Qual relação entre tempo e temperatura no processo de eliminação de microrganismos.
- 2) O que são agentes desinfetantes?

ANTIBIOGRAMA

Introdução

O antibiograma é um teste que permite a verificação *in vitro* da sensibilidade de uma bactéria aos antibióticos. Este método foi desenvolvido por **Kirby-Bauer**. A sensibilidade é demonstrada pela zona ou halo de inibição de crescimento que se forma ao redor do disco de antibiótico. De acordo com o tamanho do halo, diz-se que a bactéria é sensível, pouco sensível ou resistente. O antibiograma é uma técnica fundamental, pois permite a escolha do antimicrobiano apropriado para o controle de infecções bacterianas.

Objetivo:

Determinar a sensibilidade de algumas bactérias a diferentes agentes antimicrobianos.

Material:

- 1 - Tubo com cultura líquida de *Staphylococcus aureus*;
- 2 - Tubo com cultura líquida de *Escherichia coli*;
- 3 - Placas contendo meio sólido Mueller- Hinton (2 unidades);
- 4 - Discos com Antibióticos;
- 5 - Zaragatoas (2 unidades), Pinça (1 unidade), régua (1 unidade)

Procedimento:

1. Utilizando uma zaragatoa e a técnicas de assepsia, coletar bactérias de uma cultura fresca bacteriana;
2. Espalhar uniformemente as células sobre a superfície de meio sólido Mueller-Hinton contido numa placa de Petri;
3. Deixar secar a superfície;
4. Dispensar os discos de antibióticos na tampa da placa de Petri. Utilizando uma pinça, depositar os discos na superfície da cultura em meio sólido, tendo o cuidado de deixá-los uniformemente e bem espaçados. Não arrastar os discos sobre o meio de cultura porque a difusão inicia-se imediatamente;
5. Incubar em estufa, a 37°C, durante 16 horas.

Análise / Interpretação:

1. Utilizando uma régua, meça os diâmetros (mm) dos halos de inibição de crescimento em torno de cada um dos discos de antibióticos e registre os dados obtidos

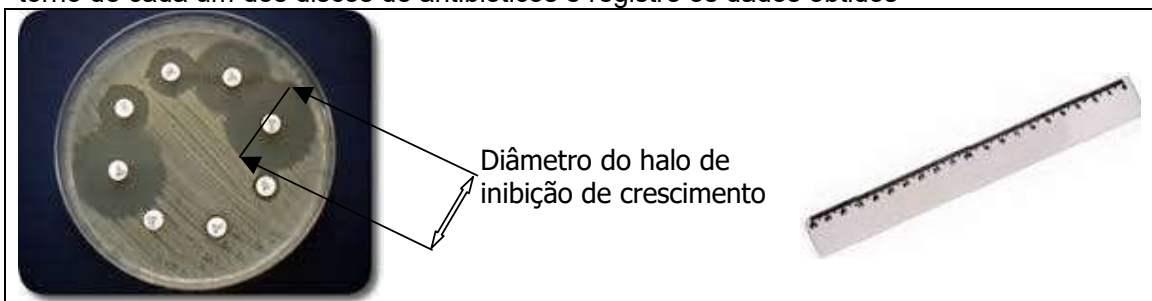


Fig. 2: Medição de halos de inibição de crescimento de colônias bacterianas

2. Utilizando a Tabela padrão (Tabela 1), analise a sensibilidade das bactérias aos diversos antibióticos pesquisados.

Tabela 1: Limites para a interpretação da Sensibilidade das bactérias aos discos de antibióticos (em mm) - ANTIBIOGRAMA.

Antibiótico	Sigla	Concentração	Resistente	Intermediário	Sensível	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Penicilina (<i>Staphylococcus</i>)	PEN	10 UI	28 ou -	28 a 29	29 ou +		
Amoxicilina (BGN) (<i>Staphylococcus</i>)	AMO	30 µg	13 ou - 28 ou -	14 a 16 28 a 29	17 ou + 29 ou +		
Ampicilina (BGN) (<i>Staphylococcus</i>)	AMP	10 µg	13 ou - 28 ou -	14 a 16 28 a 29	17 ou + 29 ou +		
Cefalotina	CFL	30 µg	14 ou -	15 a 17	18 ou +		
Cefepima	CPM	30 µg	14 ou -	15 a 17	18 ou +		
Cefoxitina (BGN) (<i>Staphylococcus</i>)	CFO	30 µg	14 ou - 24 ou -	15 a 17 24 a 25	18 ou + 25 ou +		
Vancomicina (<i>Staphylococcus</i>)	VAN	30 µg	14 ou -	14 a 15	15 ou +		
Cloranfenicol	CLO	30 µg	12 ou -	13 a 17	18 ou +		
Eritromicina (<i>Staphylococcus</i>)	ERI	15 µg	13 ou -	14 a 22	23 ou +		
Tetraciclina (BGN) (<i>Staphylococcus</i>)	TET	30 µg	11 ou - 14 ou -	12 a 14 15 a 18	15 ou + 19 ou +		
Estreptomicina							
Kanamicina							
Gentamicina	GEN	10 µg	12 ou -	13 a 14	15 ou +		
Ciprofloxacina	CIP	5 µg	15 ou -	15 a 20	21 ou +		
Rifampicina (<i>Staphylococcus</i>)	RIF	5 µg	16 ou -	17 a 19	20 ou +		
Sulfonamidas	SUL	300 µg	12 ou -	13 a 16	17 ou +		

Obs.: BGN= Bacilos Gram-negativos como *E. coli*.

QUESTÕES PARA ESTUDO

1. O que é e qual a utilidade de um Antibiógrama?
2. Quais foram os resultados experimentais obtidos pelo seu grupo? Defina o perfil de sensibilidade de cada uma das bactérias para os antibióticos testados.
3. Que explicações você pode dar para justificar a resistência encontrada frente a alguns dos antibióticos testados?
4. Por que devem ser utilizados discos de antibióticos diferentes para pesquisa de sensibilidade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas?
5. Qual a diferença de um antibiótico bacteriostático e um bactericida?
6. O que é CIM (ou MIC)?

PRÁTICA: ANTIMICROBIANOS NATURAIS

Introdução

Muitos vegetais contêm compostos que são inibidores de crescimento de microrganismos e exercem papel importante na resistência destes vegetais a patógenos. Um importante exemplo deste processo é o alho.

A presença de substâncias antimicrobianas pode ser verificada através de extratos ou partes homogeneizadas de vegetais colocados frente a culturas de microrganismos.

Objetivo:

Estudar a presença de compostos antimicrobianos em temperos vegetais.

Material

1. Placas de TSA.
2. Alho e cebola.
3. Cotonetes.
4. Graal e pistilo.
5. Discos de papel de filtro.
6. Culturas: *Staphylococcus* sp e *E. coli*.

Procedimento

1. Mergulhar o cotonete na suspensão do microrganismo;
2. Espalhar sobre a superfície do meio com o próprio cotonete embebido na cultura;
3. Macerar o alho e a cebola, separadamente, em graal,
4. Embeber os discos de papel de filtro no macerado e colocá-los sobre a superfície do meio semeado;
5. Incubar a 25°C por 2 ou 3 dias e observar os halos de inibição.

Análise / Interpretação:

QUESTÕES PARA ESTUDO

1. Como explicar os resultados obtidos?
2. Comente a vantagem da prática de emprego de condimentos como o alho no tempero de alimentos.

PRÁTICA: IDENTIFICAÇÃO DE COCOS GRAM-POSITIVOS

Introdução

Os principais gêneros de interesse médico deste grupo morfotintorial são: *Staphylococcus* e *Streptococcus*. Estas bactérias têm entre 0,8 a 1,0 µm de diâmetro e têm o potencial de causar doenças supurativas.

As bactérias do gênero *Staphylococcus*, usualmente se apresentam agrupadas em forma de cachos de uva (estafilococos). As espécies de maior importância médica são: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus epidermidis*. São bactérias piogênicas e causam, por exemplo: osteomielite, furunculose, hordéolo (terçol), impetigo, infecções urinárias, toxi-infecções alimentares.

As bactérias do gênero *Streptococcus*, formam cadeias (estreptococos). As espécies de maior importância médica são: *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. agalactiae*, *S. mutans*. Dependendo da espécie podem causar doenças como: faringite, otite média, pneumonia, meningite, septicemia puerperal, endocardite, erisipela. Podem causar, também, doenças não supurativas como glomerulonefrite e febre reumática, que são consideradas sequelas de algumas infecções anteriores. Para a diferenciação básica e confirmatória entre os gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*, utiliza-se a prova da catalase. A catalase é uma enzima produzida pelos *Staphylococcus* e não produzida pelos *Streptococcus*. Esta enzima desdobra o peróxido de hidrogênio (água oxigenada) em água e oxigênio livre ($2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$) e sua prova positiva pode ser facilmente verificada pela simples visualização de bolhas que são formadas quando se adiciona água oxigenada à cultura.

Uma vez diante de bactérias do gênero *Staphylococcus*, utiliza-se a prova da coagulase para caracterizar *Staphylococcus aureus*, espécie de grande importância médica. Esta espécie coagula o plasma pela ação da coagulase.

Uma vez diante de bactérias do gênero *Streptococcus*, a capacidade de colônias isoladas de hemolizar hemácias de carneiro presentes em meio sólido Agar sangue é considerada para iniciar a identificação das espécies, independentemente da atividade biológica destas hemolisinas. As hemolisinas são enzimas ou toxinas que destroem os glóbulos vermelhos e outras células. Existem hemolisinas, com diferentes propriedades, que são produzidas não somente pelas bactérias patogênicas como também pelas não patogênicas. Estas bactérias podem produzir halos claros em volta da colônia (halo de hemólise). No que diz respeito às bactérias do gênero *Streptococcus*, quando o halo é totalmente claro, diz-se que a hemólise é do tipo beta (destruição total das hemácias); quando esverdeado, diz-se hemólise é do tipo alfa (destruição parcial das hemácias); e, quando não há hemólise, esta é chamada do tipo gama (ausência de hemólise).

Em se tratando de uma bactéria beta-hemolítica, utiliza-se a prova da bacitracina que caracteriza *Streptococcus pyogenes*, (*Streptococcus* beta-hemolíticos do grupo A (sorogrupo A). Um disco de papel filtro contendo 0,05 unidades de bacitracina é depositado na superfície de uma placa com Ágar sangue semeado previamente com a bactéria em estudo. Os estreptococos beta-hemolíticos do grupo A são sensíveis a bacitracina e, portanto, apresentam zona de inibição de 12 a 17 mm; enquanto que, os demais grupos de estreptococos geralmente não são inibidos (Fig. 3). Em se tratando de estreptococos alfa-hemolíticos, utiliza-se de maneira semelhante a prova da optoquina (cloreto de etil-hidrocupreina). Se o estreptococo em estudo for o *Streptococcus pneumoniae* (pneumococo) haverá, uma zona de inibição de crescimento de 15 a 30 mm (Fig. 3).

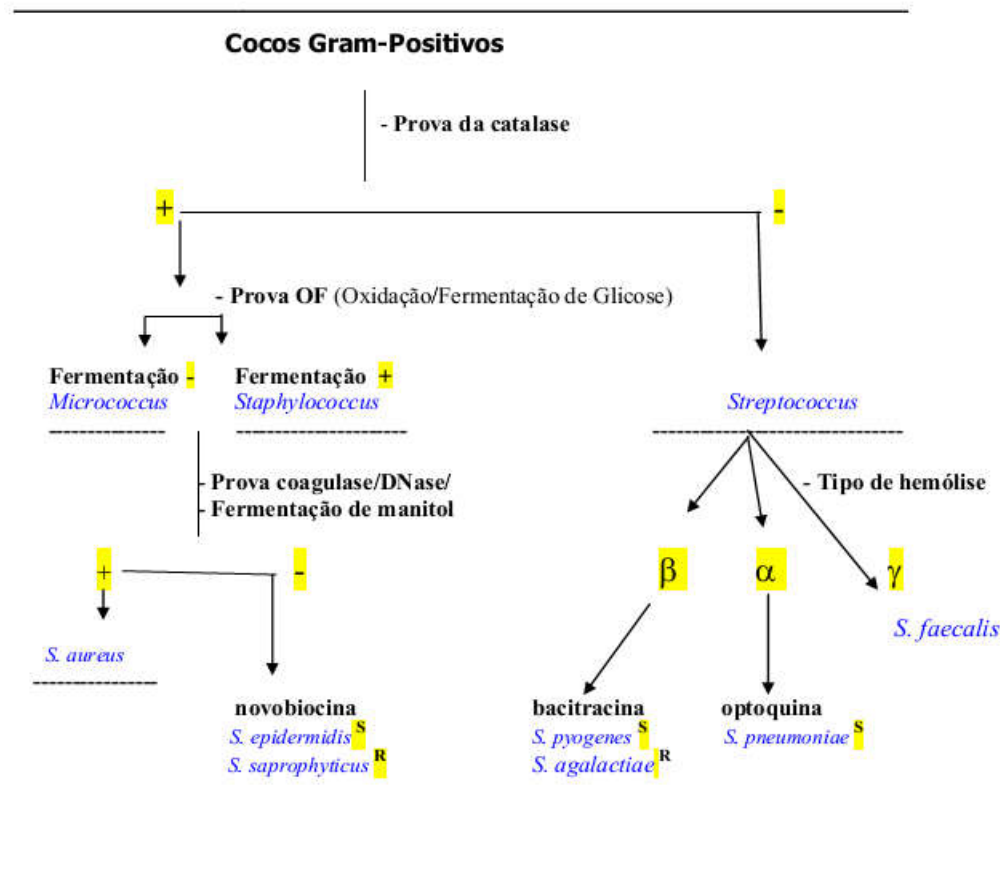


Fig. 3: Esquema simplificado para identificação de Cocos Gram-positivos.

Material:

1. Cada grupo receberá duplicatas de 4 a 7 culturas bacterianas crescidas em meio líquido (caldo) TSB identificadas por números. Cada uma destas culturas poderá ser de uma das seguintes bactérias: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. pneumoniae*, *S. faecalis*;
2. Lâminas (4-7 unidades); Bateria de corantes para a Coloração de Gram;
3. Conta gotas com H₂O₂ Volumes (1 unidade);
4. Placa com Agar-DNA (1 unidade); placa com Ágar-sangue (1 unidade);
5. Tubo com 5 ml de HCl 1M (1 unidade);
6. Culturas de *Staphylococcus* em TSA com disco de Novobiocina (Demonstração);
7. Culturas de *Streptococcus*-β Ágar-sangue com disco de Bacitracina (Demonstração);
8. Culturas de *Streptococcus*-α Ágar-sangue com disco de Optoquina (Demonstração).

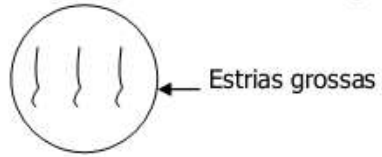
Procedimento:

1. Separar as duas Coleções de cultivos bacterianos. Cada Coleção deverá conter um exemplar de cada uma das bactérias a ser estudada/identificada.
2. Com as culturas da Coleção 1:
 - A. Realizar a coloração de Gram de todas as culturas. Anotar os resultados
 - B. Realizar a Prova da catalase de todas as culturas:
Adicionar 2-3 gotas de H₂O₂ 10 Volumes. Agitar levemente e observar se ocorre o aparecimento de bolhas efervescentes. Identificar as culturas:
 - Presença de bolhas = catalase positivas → *Staphylococcus*
 - Ausência de bolhas = catalase negativas → *Streptococcus*

3. Com as culturas da Coleção 2:

A. *Staphylococcus*:

- Realizar a prova da DNase com todas as culturas de *Staphylococcus*. Para tanto, fazer uma estria de todas as culturas catalase-positivas em meio sólido Ágar-DNA. Incubar as placas a 37° C, em estufa, por 16-24 horas.



- Semear (normalmente) todas as culturas de *Staphylococcus* em meio sólido Ágar-manitol. Incubar as placas a 37° C, em estufa, por 16-24 horas.

- Dia da Leitura:

- Sobre as culturas bacterianas crescidas em meio sólido crescidas em Ágar-DNA, verter 5 ml de HCl 1M. Incubar por 3 minutos, a temperatura ambiente. Observar se pode ser observado halo transparente ao redor de alguma colônia, evidenciando a secreção de DNase pela bactéria.

a) Presença de halo: DNase+ → *Staphylococcus aureus*;

b) Ausência de halo: Dnase- → *Staphylococcus epidermidis* ou *S. saprophyticus*;

- Observar o crescimento das culturas crescidas em meio sólido Ágar-manitol:

a) Colônias de cor amarela = fermentação positiva de manitol → *Staphylococcus aureus*.

- Observar a sensibilidade **Novobiocina**:

Sensível → *Staphylococcus epidermidis*;

Resistente → *Staphylococcus saprophyticus*

B. *Streptococcus*:

- Realizar a prova da análise do tipo de hemólise com todas as culturas de *Streptococcus*. Fazer uma estria de todas as culturas catalase-negativas em meio sólido Ágar-sangue. Incubar as placas a 37° C, em estufa, por 16-24 horas.

- Dia da Leitura:

- Observar os tipos de hemólise de cada uma das culturas:

a) **β hemólise** (hemólise total)

b) **α hemólise** (hemólise parcial)

c) **γ hemólise** (ausência de hemólise)

- Observar a sensibilidade às drogas **Bacitracina e Optoquina**:

a) Cocos Gram+, catalase-, β hemolítico, bacitracina^S = sorogrupo A → *S. pyogenes*

b) Cocos Gram + catalase -, β hemolítico, bacitracina^R → *S. agalactiae* e outros

c) Cocos Gram+, catalase -, α hemolítico, optoquina^S = *S. pneumoniae*

Análise / Interpretação:

Com base nos procedimentos realizados, identificar as bactérias presentes nas várias culturas.

QUESTÕES PARA ESTUDO

1. Os cocos Gram-negativos frequentemente estão presentes em infecções purulentas. A coloração de Gram é suficiente para diferenciar as bactérias dos gêneros *Staphylococcus* das bactérias do gênero *Streptococcus*?
2. Qual é a morfologia típica das bactérias da espécie *Streptococcus pneumoniae*?
3. Quais são as principais espécies do gênero *Staphylococcus* causadoras de doenças no homem? Como são identificados no laboratório? Quais são as principais características patogênicas? Quais são as principais doenças que causam no homem?
4. Comente sobre duas principais espécies do gênero *Streptococcus* causadoras de doenças no homem? Como são identificados no laboratório? Quais são as principais características patogênicas? Quais são as principais doenças que causam no homem?

PRÁTICA: BACILOS GRAM-POSITIVOS

(Resumo somente para estudo)

Introdução

Gênero *Clostridium*

No gênero *Clostridium*, representado por bactérias Gram-positivas, anaeróbias estritas, esporuladas, encontramos pelo menos 4 espécies de importância médica: *Cl. tetani*, *Cl. botulinum*, *Cl. perfringens* e *Cl. difficile*. Todas elas fazem parte da microbiota normal das fezes, sendo encontradas no meio ambiente contaminado por estas (solo, vegetais, água) na sua forma esporulada, podendo, em condições especiais, produzir doenças bastante graves no homem e nos animais.

O *Cl. tetani* é responsável pelo desenvolvimento do tétano que, nos indivíduos susceptíveis, (não vacinados), vítimas de contusões traumáticas que favoreçam um ambiente de anaerobiose, se caracteriza por contrações espásticas da musculatura, ocasionada por uma toxina denominada tetanoespasmina. Esta toxina inibe a liberação da glicina que é responsável pela inibição da neurotransmissão, fazendo com que exista uma constante ação da acetilcolina, causando uma contração espástica dos músculos extensores e flexores simultaneamente.

A espécie *Cl. botulinum* é compreendida por vários subtipos, sendo que, somente os dos grupos A, B, E e F ocorrem no homem. As vias de transmissão destas bactérias são alimentos enlatados, embutidos, ou conservas caseiras feitas, mormente com carne e vegetais. Os esporos do *Cl. botulinum* são bastante resistentes à fervura e, quando tais alimentos são preparados e estocados, os mesmos germinam e produzem uma toxina que tem ação inibidora da liberação de acetilcolina, que é a mediadora da contração muscular, causando uma paralisia flácida. Em ambos os casos, a morte se dá por paralisia respiratória.

O *Cl. perfringens* tem vários tipos, sendo os dos tipos A e C, os patogênicos para o homem. Estão envolvidos em casos de gangrena gasosa no homem, sempre como consequência de ferimentos profundos, que comprometam a circulação local, contribuindo para uma anóxia tecidual que favorece a germinação dos esporos. A bactéria produzirá várias toxinas, entre elas, a toxina α , que é uma lecitinase. Em mulheres que provocam o aborto em condições precárias de higiene, pode ocorrer o chamado aborto séptico, que se trata de uma mionecrose do útero, sempre rápida e fatal. Os tipos A e C produzem uma enterotoxina responsável por intoxicações alimentares.

O *Cl. difficile* ocorre somente em casos de indivíduos submetidos a uma antibioticoterapia intensa e demorada, em especial quando se usa a clindamicina, embora possa ocorrer com qualquer antibiótico de largo espectro. Todos os clostrídios são Gram-positivos, porém as células bacterianas são Gram-negativas na fase de esporulação.

Gênero *Corynebacterium*

Dentre as Corinebactérias que merecem destaque, encontramos o *C. diphtherae*, causador do chamado “crupe”, ou difteria. Esta enfermidade se deve à produção por amostras da bactéria que estão lisogenizadas por um fago (β), sendo este o responsável pela produção da toxina diftérica que inativa o fator de alongamento EF2. As Corinebactérias se caracterizam por serem bactérias Gram-positivas, com grânulos de metáfosfato em seu interior, denominados de granulações metacromáticas. Estas granulações são visíveis por colorações especiais, ou até mesmo com azul de metileno, e se coram em vermelho, daí o nome derivado de metacromasia. A bactéria não é invasora, e a lesão que é caracterizada por uma pseudomembrana fica, geralmente, restrita ao trato aéreo superior, a partir de onde a toxina invade a corrente circulatória causando lesões graves em vários órgãos, em especial coração (miocardite), rins e nervos (neurite).

Gênero *Bacillus*

No gênero *Bacillus*, encontramos várias bactérias que têm como habitat o solo, o ar e a água. Entre os patogênicos para os animais e para o homem se destaca o *B. anthracis* causador no gado do carbúnculo hemático e, no homem do antrax, ou antraz (antraz não é a denominação correta). A importância deste agente aumentou consideravelmente nos dias atuais, devido às ameaças do bioterrorismo. Outra bactéria do gênero que pode causar intoxicações alimentares no homem é o *B. cereus*. A maioria dos bacilos cresce rapidamente em meios simples formando colônias grandes em meio sólido. Geralmente, quando se observam as bactérias coradas pelo método de Gram, é possível visualizar-se estruturas intracelulares arredondadas que não se coram correspondentes aos esporos.

Material

Em cada laboratório serão colocados dois grupos de materiais constituídos por:

1. Uma jarra do tipo Gaspak para demonstração de como se proceder para cultivos de bactérias anaeróbias. Acompanham dois envelopes de ANAEROGEN.
2. Placas de TSA (Tryptic Soy Agar) semeadas com *Bacillus subtilis*.
3. Dois grupos de 3 tubos contendo meio de tioglicolato.
4. Culturas de *Escherichia coli* (anaeróbio facultativo), *Pseudomonas aeruginosa* (aeróbio estrito) e *Clostridium perfringens*.

Procedimento

1. Demonstração de como se incuba para anaerobiose com jarra Gaspak;
2. Fazer esfregaços das culturas de *B. subtilis* semeada no meio TSA e realizar a coloração de Gram, procurando verificar se existem esporos (zonas não coradas dentro do corpo bacteriano);
3. Semear como indicado pelo professor os meios de tioglicolato, com cada uma das 3 bactérias (*Cl. perfringens*, *P. aeruginosa* e *E. coli*).

QUESTÕES PARA:	ESTUDO
-----------------------	---------------

1. Qual a finalidade de se ter semeado as 3 bactérias em meio de tioglicolato e por que o *Cl. perfringens* foi capaz de crescer neste meio, já que é um anaeróbio estrito. A *Pseudomonas aeruginosa* cresceu só na superfície do meio? Por quê?
2. Supondo-se que o *B. subtilis* fosse o *B. anthracis*. Que risco você antecipa, se é que existe algum, em se lidar com uma cultura deste tipo sem utilizar proteção e demais cuidado laboratorial?
3. Um técnico de laboratório acidentalmente se inoculou com uma cultura de *C. diptherae*. O que você acha que pode acontecer, supondo que ele tenha se submetido à vacinação com DTP, conforme recomendado pelas autoridades sanitárias?

PRÁTICA: IDENTIFICAÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS

Introdução

As bactérias da família *Enterobacteriaceae* são bastonetes Gram-negativos, fermentadores de glicose, anaeróbios facultativos, móveis ou imóveis (quando móveis são portadores de flagelos peritríquios), oxidase positivos, e reduzem nitratos a nitritos.

A diferenciação das bactérias desta família é realizada com provas bioquímicas (biotipagem). Para a identificação das espécies ou dos tipos bacterianos, podem ser utilizadas provas complementares, que consistem em: testes sorológicos (sorotipagem: antígenos somáticos-O, antígenos capsulares-K, antígenos flagelares-H); e/ou, análise da reação frente a bacteriófagos específicos (fagotipagem). Este conjunto de testes é muito utilizado na prática, principalmente no que diz respeito à identificação das categorias de *E. coli* enteropatogênicas para o homem: EPEC, EIEC, ETEC, EHEC, EAEC, etc.

Para a realização das provas bioquímicas, há vários conjuntos de testes e às vezes são disponibilizados também na forma de "Kits".

Objetivo

Realizar a identificação de uma bactéria da família *Enterobacteriaceae*.

Material

1. Cada grupo receberá 1 a 2 culturas bacterianas crescidas em meio sólido TSA. Cada uma destas culturas poderá ser de uma das seguintes bactérias: *E. coli*, *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Proteus* spp, *Klebsiella* spp;
2. Lâminas (1-2 unidades); Bateria de corantes para a Coloração de Gram;
3. Placa contendo meio sólido MacConkey (1-2 unidades);
4. Série Bioquímica (EPM, MILi, CITRATO) (1 - 2 conjuntos por grupo);
5. Alça de platina e Agulha.

Procedimento:

1. Realizar a coloração de Gram das culturas;
2. Semear a cultura, utilizando alça de platina, no meio sólido MacConkey;
3. Semear a cultura, utilizando a Agulha, nos tubos contendo os meios EPM, MILI, CITRATO. Para tanto, em cada uma das sementeiras:
 - coletar bactérias;
 - inserir a agulha verticalmente até a base (fundo) do meio sólido e remover perturbando o ágar o menos possível. Nos tubos com Agar inclinado (EPM, CITRATO) espalhar as bactérias também na superfície;
4. Incubar todos os cultivos (2 e 3 acima) a 37°C, em estufa, por 16-24 horas

Resultados/Interpretação:

1. Realizar a Leitura da série Bioquímica: Seguir a sequência indicada abaixo: A, B, C e D.
2. Procurar identificar o microrganismo, utilizando as informações abaixo (**Figs. 4 a 7 e Quadro** abaixo);
3. Observar o quadro no laboratório com as bactérias controle
4. Identificar as bactérias entregues para o seu grupo. Anotar e relatar os Resultados.

Provas Bioquímicas para Identificação de Enterobactérias:

A) Meio sólido - Ágar MacConkey

Prova 1: FERMENTAÇÃO DE LACTOSE (Fig. 4):

- Colônias de coloração vermelha: Lactose positiva
- Colônias de coloração branca: Lactose negativa

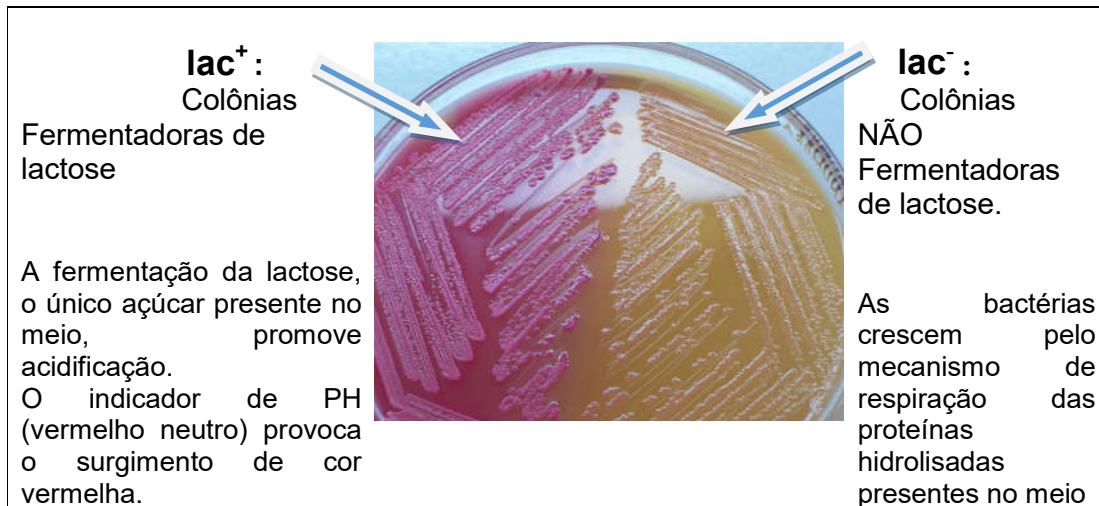


Fig. 4: Prova bioquímica da fermentação de lactose em meio MacConkey.

B) Meio Ágar CITRATO DE SIMMONS (Fig. 5)

Prova 2: CITRATO DE SIMMONS

Prova positiva: coloração azul

Prova negativa: coloração inalterada do meio (verde), ausência total de crescimento.



Fig. 5: Prova bioquímica do meio Citrato de Simmons.

C) Meio de MILi (Motilidade, Indol e Lisina-descarboxilase) (Fig. 5):
Os testes de Motilidade e L-Lisina descarboxilase são verificados na base.

Prova 8: MOTILIDADE

Prova positiva: meio turvo.

Prova negativa: meio límpido ou crescimento só no local do inóculo.

Prova 9: INDOL. É realizada adicionando-se algumas gotas do reativo de Kovacs (dietilaminobenzaldeído) na superfície do cultivo.

Prova positiva: coloração vermelha.

Prova negativa: coloração amarela.

Prova 10: L-LISINA DESCARBOXILASE

Prova positiva: coloração roxa.

Prova negativa: coloração amarela.

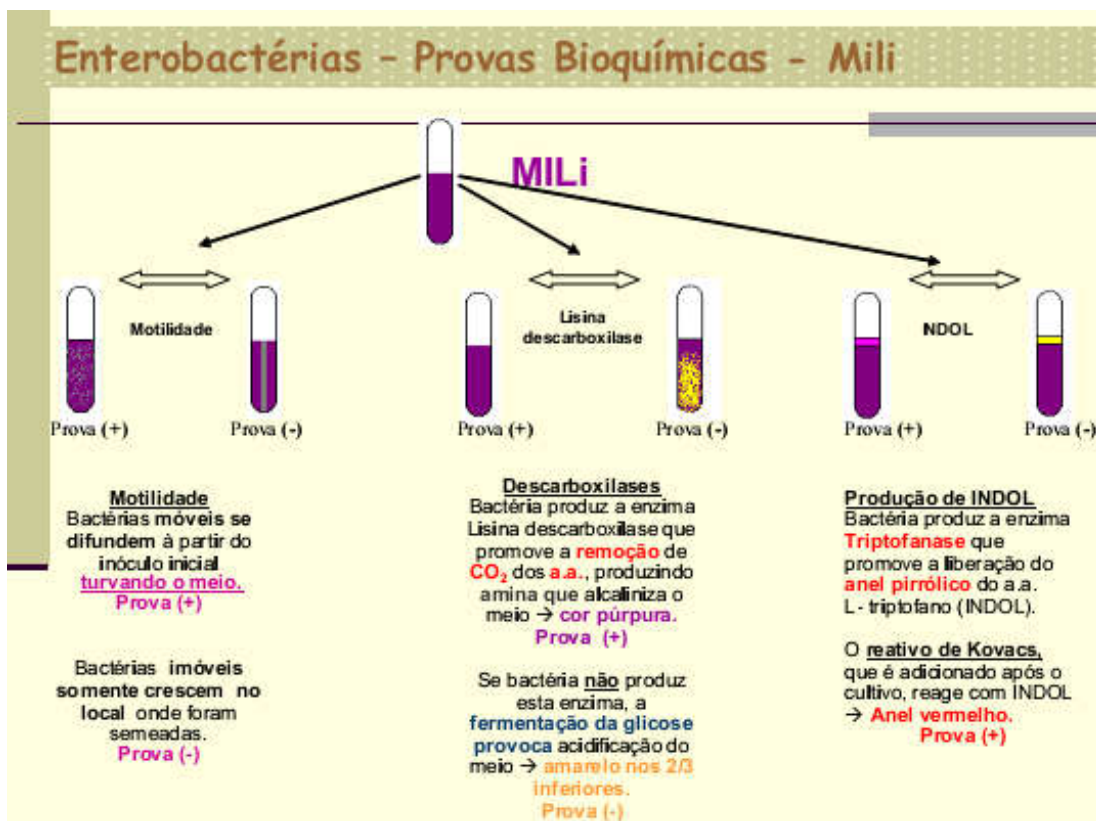


Fig. 6: Provas bioquímicas do meio MILi.

D) Meio EPM (Escola Paulista de Medicina) (Fig. 6):

Prova 3: Fermentação de GLICOSE:

Prova Positiva: base amarela.

Prova Negativa: base inalterada (verde)

Obs.: Todas as Enterobactérias são fermentadoras de glicose

Prova 4: Fermentação de GLICOSE com PRODUÇÃO DE GÁS.

Prova Positiva: base amarela, com presença de bolhas de ar.

Prova Negativa: base amarelada, sem bolhas de ar.

Prova 5: Produção de H₂S:

Prova Positiva: base enegrecida – máscara (atrapalha) a leitura das provas: fermentação de GLICOSE, fermentação de GLICOSE com produção de gás, UREASE;

Prova Negativa: base não enegrecida.

Prova 6: Produção de UREASE:

Prova positiva: base inclinada azul.

Prova negativa: base inclinada amarela ou inalterada.

Prova 7: Produção de TRIPTOFANO DESAMINASE:

Prova Positiva: topo da inclinação verde escuro.

Prova Negativa: topo da inclinação azulado, amarelo ou inalterado.

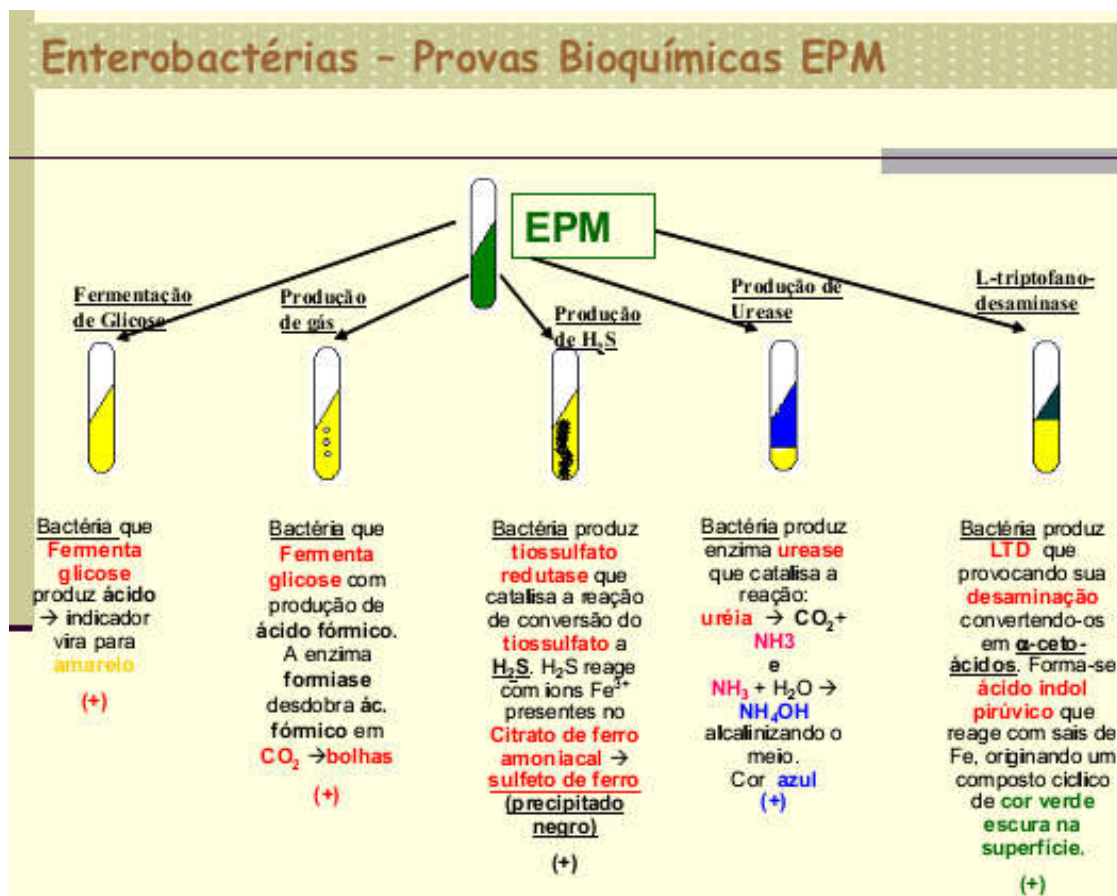


Fig. 7: Provas bioquímicas do meio EPM.

Quadro: Identificação bioquímica parcial de Enterobactérias.

Bactérias	EPM					MILI			CITRATO
	Lactose	Glicose com produção de gás	H ₂ S	Urease	LTD	Motilidade	Indol	Lisina Descarboxilase	Citrato de Simmons
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	-	-	-/+	+	+	-
<i>Klebsiella spp</i>	+	+	-	+	-	-	-	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	-	-/+	-	+	-	-/+	+
<i>Citrobacter freundii</i>	-/+	+	-/+	-/+	-	+	-/+	-	+
<i>Arizona</i>	+	+	+	-	-	+	-	+	+
<i>Shigella sp</i>	-	-	-	-	-	-	-/+	-	-
<i>Edwardsiella tarda</i>	-	+	-/+	-	-	+	+	+	-
<i>Salmonella spp</i>	-	+	+	-	-	+	-	+	+/-
<i>Serratia marcescens</i>	-	+	-	-/+	-	+	-	+	+
<i>Proteus mirabilis</i>	-	+	-/+	+	+	+	-/+	-	-/+
<i>Providencia rettgeri</i>	-	+/-	-	-	+	+	+	-	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	+/-	-	-	+	-	-/+	-/+	-	-/+

Obs.: LTD: L-triptofano desaminase

Reações sorológicas para identificação de sorogrupos de *Escherichia coli* (Demonstração)

Procedimento:

1. Com auxílio de 3 ml de salina, obteve-se uma suspensão bacteriana densa da cultura de *E. coli* em Ágar nutriente. A suspensão final foi fervida, para destruição do antígeno K (que impede a aglutinação somática - antígeno O).
2. Com o auxílio de uma alça, depositar um pouco da suspensão bacteriana sobre o lado esquerdo de uma lâmina limpa e desengordurada. Adicionar uma gota de um dos antissoros específicos e, com o auxílio de um palito estéril, homogeneizar. Do lado direito da lâmina, depositar da mesma forma outra amostra da suspensão bacteriana e adicionar uma gota de solução fisiológica estéril (controle). Repetir o procedimento com o outro antissoro.
3. Após um minuto observar se houve aglutinação com algum dos antissoros. Em não ocorrendo aglutinação com solução fisiológica (cultura rugosa), identificar o sorogrupo da suspensão da cultura recebida.

QUESTÕES PARA ESTUDO

1. Quais foram as bactérias identificadas pelo seu grupo?
2. Compare os resultados do seu grupo com outros grupos de seu laboratório.
3. Pesquise:
Quais são os meios seletivos empregados para o estudo das Enterobactérias. Como eles funcionam
4. Quando e porque às vezes é importante se realizar provas sorológicas, principalmente quando se trata de identificação de Enterobactérias?
5. Quais são as doenças causadas pelas bactérias estudadas na aula prática?
6. Qual a diferença de Diarreia e Disenteria?
7. Pesquise:
 - a). Quais são os sorotipos de *E. coli* que causam Diarreia?
 - b). Quais são os sorotipos de *E. coli* que causam Disenteria bacilar?
8. Pesquise:
Quais são demais Enterobactérias que causam Disenteria bacilar?
9. Pesquise:
Quais as outras doenças frequentemente provocadas por *E. coli* além de Disenteria Diarreia? São as mesmas bactérias ou bactérias de outros sorotipos.
10. Pesquise:
Quais as outras doenças frequentemente provocadas pelas demais Enterobactérias além de Disenteria e Diarreia?

PRÁTICA: VISUALIZAÇÃO DE LÂMINAS COM ESPIROQUETÍDEOS

(*Treponema* e *Leptospira*)

Introdução

Os espiroquetideos de importância médica pertencem à:

- Família *Spirochaetaceae*: bactérias do gênero *Treponema* e do gênero *Borrelia*
- Família *Leptospiraceae*: bactérias do gênero *Leptospira*

Estas são bactérias muito finas (de espessura muito reduzida) e por isto apesar de possuírem envoltórios semelhantes aos de bactérias Gram-negativas, mesmo após coloração de Gram, não são visíveis ao M.O. comum. Para sua visualização ao M.O. é necessário:

- Coloração pela impregnação com prata (coloração Fontana-Tribondeau, para espessamento);
- Emprego de técnicas especiais de microscopia (campo escuro, coloração negativa, imunofluorescência).

São bactérias longas e flexíveis (0,1 mm diâmetro x 10-20 mm comprimento) e possuem filamento axial (endoflagelo) constituído por feixes de fibrilas nas extremidades da célula e se dirigem à região central. Possuem movimentação: rotação em torno do próprio eixo, flexão e estiramento, e de difusão.

Outras bactérias espiraladas de importância médica são:

- *Helicobacter pylori*,
- *Campylobacter jejuni*

Material

1. Lâminas com bactérias espiraladas coradas pela Coloração Fontana-Tribondeau (prata):
 - *Treponema pallidum* isolado de Cancro duro
 - *Leptospira* spp;
2. Microscópio de Campo escuro.

Procedimento

1. Visualizar as lâminas com bactérias espiraladas, empregando-se:
 - Coloração **Fontana-Tribondeau** (espessamento com prata);
 - **Microscopia de Campo escuro** (vivas).

Resultados

Desenhar os campos e comentar sobre as visualizações.

QUESTÕES PARA ESTUDO

1. Quais são as técnicas empregadas para visualização ao M.O. de bactérias espiraladas?
2. Por que a coloração de Gram não é empregada para visualização de bactérias espiraladas?
3. No que se baseia a Coloração de Fontana-Tribondeau, por que ela possibilita a visualização de bactérias espiraladas?
4. O que é microscopia de campo escuro e porque ela é importante?

PRÁTICA: VISUALIZAÇÃO DE LÂMINAS CORADAS PELA COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELSEN

Introdução: As micobactérias são bacilos álcool-ácido-resistentes (BAAR), ou seja, são bactérias na forma de bacilos que, após terem sido coradas pela fucsina, não se deixam decorar por uma mistura de álcool e ácido clorídrico. Esta propriedade parece decorrer da firme fixação da fucsina a certos lipídeos presentes na parede das micobactérias. Esta coloração foi desenvolvida por Ziehl-Neelsen.

Os BAAR são agentes etiológicos de enfermidades que ocorrem em homens e animais. Neste último caso também podem ser consideradas zoonoses. As espécies de maior importância são: *Mycobacterium tuberculosis* (agente causal da tuberculose humana); *Mycobacterium bovis*, (tuberculose bovina, que pode ser transmitida ao homem pelo leite in natura) e *Mycobacterium leprae* (agente causal da Hanseníase ou Lepra).

Dentro deste gênero, existem outras espécies que são consideradas oportunistas, ou atípicas, ou ainda MOTT (*Mycobacterium Other than Tubercle Bacilli*). Geralmente, só causam doenças quando existe uma imunodepressão ou outras moléstias intercorrentes afetando os pulmões, tais como: silicose, asbetose, ou qualquer outra patologia pulmonar. Atualmente, por causa da AIDS tem ocorrido um aumento significativo de casos de tuberculose em pacientes HIV+, causados pelo *M. tuberculosis* e as Micobactérias oportunistas, em especial as do complexo MAIS (ou *M. avium*, *M. scrofulaceum* e *M. intracellulare*). O diagnóstico, em qualquer dos casos de origem pulmonar, se faz pelo exame do escarro, corando-se pela técnica de Ziehl-Neelsen, seguido de cultivo em meios específicos como Löwenstein-Jensen, ou Middlebrook7H10 e identificação por métodos bioquímicos especiais. Recentemente, também esta sendo empregado o PCR.

Material

1. Lâminas sabidamente positivas para BAAR (*M. tuberculosis*) para serem coradas pelo método de Ziehl-Neelsen (vide método abaixo).
2. Várias culturas de BAAR, em especial *M. tuberculosis*, e algumas micobactérias oportunistas. Bactérias com pigmentação como: *M. kansasii*, *M. goodnae* e outras não cromogênicas como: *M. avium* e/ou *M. intracellulare*;
3. Bateria de corante para coloração de Ziehl-Neelsen.

Procedimento

1. Esfregaço, já fixado, de secreção pulmonar (escarro);
2. Realizar a coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen para observar os BAAR;

3. Coloração de Ziehl Neelsen:

- a) Cobrir os esfregaços com fucsina de Ziehl. Aquecer até a emissão de vapores (Não deixar o corante secar). Esperar 5 minutos;
- b) Lavar com água corrente;
- c) Decorar com álcool (97%), ácido clorídrico (1%);
- d) Lavar em água corrente;
- e) Corar com azul de metileno por 1 minuto;
- f) Lavar e secar;
- g) Observar ao microscópio as lâminas coradas;

Resultados

QUESTÕES PARA:	ESTUDO
----------------	--------

1. O que são BAAR? Estas bactérias são de crescimento lento ou rápido? Quais são as principais características específicas destas bactérias?
2. Por que, quando se suspeita de tuberculose, a coloração de Gram não é empregada para a análise bacterioscópica do escarro na tentativa de identificação de micobactérias?
3. A tuberculose voltou a ser uma doença que preocupa os órgãos de defesa sanitária de vários países, inclusive do Brasil. É somente a bactéria *M. tuberculosis* que esta sempre envolvida nestes quadros clínicos?
3. Quais as principais características de semelhanças e diferenças entre *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae*?

VIROLOGIA

PRÁTICA - EFEITO CITOPÁTICO DE VÍRUS

Demonstração de efeito citopático induzido por alguns vírus em células cultivadas "in vitro" e de corpúsculos de inclusão em tecido infectado.

Introdução:

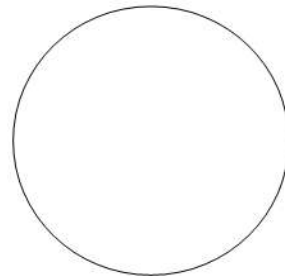
As alterações morfológicas que ocorrem quando células em cultura são infectadas por vírus são, até certo ponto, características para cada grupo de vírus e recebem o nome de efeito citopático. O efeito citopático não permite a identificação do vírus, mas fornece uma base para um agrupamento preliminar deste vírus. As alterações patológicas mais detalhadas podem ser estudadas através da infecção de células em monocamada, cultivadas sobre lamínulas. Após o aparecimento do efeito citopático, causado pela infecção com vírus, as lamínulas são fixadas, coradas através de métodos citológicos de coloração, como por exemplo, o método da hematoxilina-eosina, e montadas em lâminas de microscópio.

Os vírus multiplicam-se no núcleo ou no citoplasma das células, onde se agrupam formando massas chamadas de "corpúsculos de inclusão". Assim, nas lesões produzidas nos tecidos infectados pelos vírus, do homem ou de outros animais, poderemos encontrar células com corpúsculos de inclusão que, pelas suas características permitem a identificação do vírus que os produz e, portanto, chegar ao diagnóstico da doença.

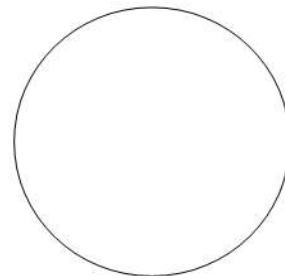
Exercício Efeito Citopático

Observar ao microscópio as lâminas apresentadas e fazer um esquema dos efeitos citopáticos observados.

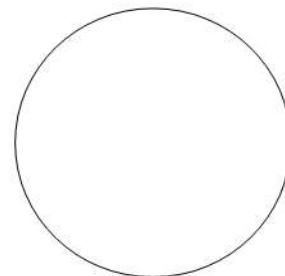
a) Células do tipo epitelial, de cultura normal, não inoculada, formando camada monocelular contínua. Apresentam o citoplasma corado em rosa e o núcleo em azul, com um, dois ou três nucléolos bem evidentes.



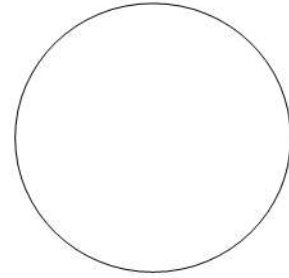
b) **Efeito citopático produzido por poliovírus e outros picornavírus:** As células apresentam-se pequenas, com formas irregulares, isoladas ou em grupos, com o citoplasma eosinófilo e núcleo picnótico e reduzido em volume.



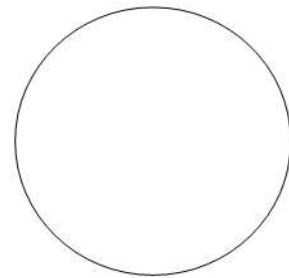
c) **Efeito citopático produzido por adenovírus:** As células infectadas apresentam-se grandes, arredondadas, e, às vezes, reunidas em "cachos", com alterações nucleares evidentes e características. **Corpúsculos de inclusão:** eosinófilos nucleares ou massas cristalinas basofílicas, segundo o tipo de adenovírus.



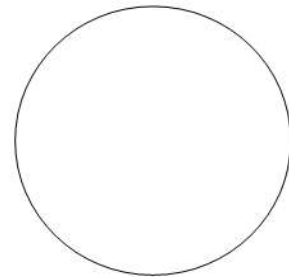
d) **Efeito citopático produzido pelo vírus do sarampo:** As células infectadas mostram-se multinucleadas, hiperplásicas, mas seus núcleos apresentam estruturas ainda conservadas. Há "pontes citoplasmáticas" intercelulares, que conferem a algumas células, forma estrelada. **Corpúsculos de inclusão:** eosinófilos, nucleares ou citoplasmáticos.



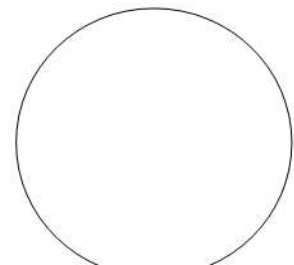
e) **Efeito citopático produzido pelo vírus do Herpes simplex:** as células infectadas apresentam-se mono ou multinucleadas (sincícios), com núcleos em graus variáveis de degeneração. **Corpúsculos de inclusão:** nucleares e eosinófilos, circundados por halo claro (corpúsculo de inclusão Lipschutz).



f) **Efeito citopático produzido pelo vírus da vaccínia:** As células infectadas apresentam-se multinucleadas, formando sincícios. **Corpúsculos de inclusão:** eosinófilos e citoplasmáticos (corpúsculos de inclusão de Guarnieri).



g) **Corpúsculo de inclusão da citomegalia:** O vírus da citomegalia é um vírus DNA pertencente ao grupo dos Herpesvírus. O material da lâmina é corte histológico de glândula salivar, corado pelo método da hematoxilina/eosina. São vistas células aumentadas de tamanho (cerca de oito vezes o das células normais circundantes), fazendo saliência na luz dos ductos salivares. Os núcleos se tornam volumosos e forma-se um corpúsculo de inclusão no seu interior, que está corado em azul escuro e circundado por um halo claro.



QUESTÕES PARA ESTUDO

- 1). Consultando no seu livro de Microbiologia os capítulos específicos sobre cada família de vírus preencha o Quadro abaixo.
- 2). Por que os corpúsculos de inclusão do Adenovírus e do vírus Herpes são nucleares, enquanto os do vírus Vaccinia são citoplasmáticos?
- 3). Que estrutura viral está relacionada à formação de sincício? Por quê?

Quadro: Descrição de alguns vírus de importância clínica.

VÍRUS	FAMÍLIA	Estrutura do capsídeo (simetria)	Presença de envoltório	Ácido nucléico (classe)	Formação de sincício	Local de multiplicação na célula
Poliovírus	<i>Picornaviridae</i>					
Adenovírus	<i>Adenoviridae</i>					
Vírus do sarampo	<i>Paramyxoviridae</i>					
Herpes simplex	<i>Herpesviridae</i>					
Vírus da vaccinia	<i>Poxviridae</i>					
Vírus da Citomegalia	<i>Herpesviridae</i>					

PRÁTICA: REAÇÃO DE HEMAGLUTINAÇÃO

INTRODUÇÃO

Alguns vírus ou antígenos derivados de vírus, adsorvem-se às hemácias através de receptores existentes na membrana destas. Como resultado, as hemácias se aglutinam, sendo este fenômeno denominado de hemaglutinação.

A reação de hemaglutinação é uma técnica simples. Basicamente, hemácias em suspensão são colocadas em contato com uma suspensão de vírus ou do antígeno hemaglutinante. Por ação da gravidade, na ausência de vírus, as hemácias sedimentam na forma de um botão compacto, no fundo do tubo ou da placa e as hemácias aglutinadas sedimentam de forma difusa.

Dependendo do vírus, há uma grande variação na espécie animal cujas hemácias vão ser aglutinadas. Assim, alguns vírus aglutinam hemácias de uma grande variedade de espécies. O vírus de influenza, por exemplo, aglutina hemácias de galinha, cobaia, carneiro e humanas do grupo O. Outros vírus, aglutinam hemácias apenas de uma espécie, como é o caso do vírus do sarampo, que só aglutina hemácias de macaco.

A reação de hemaglutinação pode ser usada para detecção ou identificação preliminar de vírus isolados de pacientes, pesquisando-se quais as hemácias que estes vírus aglutinam. Pode, também, ser usada para titular os vírus hemaglutinantes, determinando-se a mais alta diluição de vírus que ainda é capaz de aglutinar hemácias.

As hemaglutininas virais são proteínas antigênicas e, quando um vírus infecta o organismo humano ou animal, há a produção de anticorpos específicos contra as hemaglutininas virais. Estes anticorpos, presentes no soro, são capazes de se combinar com o vírus *in vitro*, inibindo assim a hemaglutinação. Na infecção, *in vivo*, esses anticorpos inibem o reconhecimento de receptores celulares, inibindo a infecção. Este é o princípio da reação de inibição da hemaglutinação, que tem grande utilidade no diagnóstico das viroses. Esta reação pode ser usada para identificar vírus isolados de pacientes, usando antisoros-padrão específicos ou, ainda, para dosar anticorpos no soro de pacientes, usando-se vírus-padrão mantidos no laboratório. Neste último caso, para diagnóstico, devem-se colher duas amostras de soro do paciente: uma na fase aguda, logo que se manifesta a doença e outra na fase convalescente, duas semanas após a primeira. Se houver um aumento do título de anticorpos inibidores da hemaglutinação de pelo menos 4 vezes para um determinado vírus pode-se fazer um diagnóstico seguro de infecção recente por este vírus. Este aumento de título de anticorpos inibidores da hemaglutinação, de pelo menos 4 vezes, é chamado de soroconversão.

Exercício prático 1: Reação de hemaglutinação

Objetivo: demonstração da presença de um agente viral através da detecção da hemaglutinina produzida pelo mesmo e dosagem desse vírus.

Material:

- 1) 80 µL de suspensão de vírus Influenza (líquido alantóico de ovo embrionado de galinha),
- 2) 1,5 mL de solução fisiológica,
- 3) 1,5 mL de suspensão de hemácias de galinha a 1%,
- 4) 1 micropipeta de 100 µL e ponteiras
- 5) placa escavada para microtitulação (fundo em “U”),
- 6) potes de descarte

Metodologia:

1. Com a micropipeta, distribuir 50 µL de solução fisiológica em todos os orifícios da linha A da placa de HA.
2. Com uma nova ponteira, adicionar 50 µL da suspensão viral somente no primeiro orifício da linha A da placa de HA.
3. Homogeneizar bem a suspensão do vírus Influenza (diluição 1/2) e transferir 50 µL para o 2º orifício da série. Homogeneizar novamente e transferir 50 µL para o 3º orifício. Repetir esse passo sucessivamente até o orifício A10 (diluição 1/1024). Descartar a ponteira no pote de descarte. **Atenção:** nos orifícios A11 e A12, não adicionar diluições de vírus, pois serão os controles de hemácias da reação.
4. A seguir, com uma nova ponteira, adicionar 100 µL da suspensão de hemácias de galinha (levemente homogeneizada), em todos orifícios correspondentes às diluições seriadas (A1 até A10) e nos controles (A11 e A12).
5. Agitar suavemente a placa e incubar à temperatura ambiente, por 40 minutos, sobre uma folha de papel branca. Fazer a leitura e anotar no protocolo.

Exercício prático 2: Reação de inibição da hemaglutinação

Objetivo: demonstração da dosagem de anticorpos inibidores da hemaglutinação, em 2 amostras de soro de um mesmo paciente, colhidas na fase aguda e na fase de convalescença.

Para a reação de inibição da hemaglutinação, os soros colhidos dos pacientes são diluídos na placa (1/2 a 1/1024) e cada diluição é colocada em contato com um volume fixo de uma suspensão viral, contendo 4 unidades hemaglutinantes. Esta mistura é incubada por 1 hora a 37°C, para permitir a reação do anticorpo com antígeno. A seguir, 1 gota de suspensão de hemácias é adicionada a cada orifício da placa. Após incubação de 30 minutos, faz-se a leitura da reação. Nos orifícios onde existem anticorpos em quantidade suficiente para se combinar com a hemaglutinina viral, observa-se a inibição da hemaglutinação, evidenciada pela sedimentação das hemácias, formando um botão fechado; nos orifícios onde não existem anticorpos, as hemácias serão aglutinadas pelos vírus livres, sedimentando em forma de um aglomerado irregular. O título do soro é determinado como sendo igual à recíproca da maior diluição capaz de inibir completamente a hemaglutinação.

Material:

As placas, preparadas para a aula, já estão com os soros da fase aguda e da fase convalescente diluídos na base 2 (de ½ a 1/1024), e cada diluição foi adicionada de 4 unidades hemaglutinantes de vírus.

Técnica:

- Adicionar 100 µL de solução de hemácias 1% a cada orifício da placa;
- Agitar suavemente;
- Incubar por 30 minutos;
- Fazer a leitura e anotar no protocolo;

Leitura:

- Nos orifícios "controle", isto é, aqueles nos quais se dispensou apenas a solução fisiológica e as hemácias, estas devem sedimentar, por ação da gravidade, formando ao fundo da cavidade um botão fechado, central;
- Nos orifícios que contém aglutinina viral, as hemácias formam uma malha, ou seja, um aglomerado irregular;
- Nos orifícios que receberam soro do paciente, vírus e hemácias se o soro tiver anticorpos estes vão recobrir os vírus e impedir que estes se liguem às hemácias. Portanto, na presença de anticorpos as hemácias sedimentam; na ausência de anticorpos os vírus estão livres e se adsorvem às hemácias, causando a aglutinação.

Convenciona-se como:

- uma unidade hemaglutinante (UHA), a maior diluição do vírus que é capaz produzir hemaglutinação, no volume considerado (50µl);
- título do antígeno viral, a recíproca desta maior diluição. Por exemplo: se tivermos uma unidade na diluição 1/128, em 50µl, o título do antígeno viral será de 128 UHA/50µl. Para se obter uma suspensão contendo 4 unidades hemaglutinantes (no volume em questão), devemos diluir a suspensão viral 4 vezes menos. Esta diluição corresponde àquela do 3º orifício, contado de trás para diante, a partir do orifício que contém uma unidade.
- Na reação de inibição da hemaglutinação o título do soro corresponde à recíproca da maior diluição deste que é capaz de inibir a hemaglutinação e é expresso em unidades inibidoras da hemaglutinação (UIHA).

Anote, nos protocolos a seguir, os resultados obtidos pelo seu grupo. Marque nas respectivas casas: + para aglutinação e - para sedimentação.

Reação de Hemaglutinação

Data: ___/___/___ Hemácias: **galinha 1%**

Diluyente: solução fisiológica

Vírus: Influenza

Diluição	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	C	C

Questão 1: Qual o título, definido em UHA, da amostra de vírus Influenza que você recebeu?

Resposta: _____

Questão 2: Qual a diluição que conterà 4 UHA/50µl ?

R.: _____

Reação de Inibição da Hemaglutinação

Data: ___/___/___
Diluyente: solução fisiológica
Vírus: Influenza

Hemácias: galinha 1%
Soros: A - fase aguda
C - fase convalescente

Diluição	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	C	C
Aguda												
Convalescente												

Questão 3: Qual o título, definido em UIHA, da amostra de soro da fase aguda?

R.: _____

E da amostra de soro da fase de convalescência?

R: _____

Questão 4: Houve soroconversão?

R.: _____

Questão 5: Qual o significado da soroconversão?

R.: _____

Questão 6: Pesquisar nos livros textos: Quais os vírus ou as famílias de vírus que possuem hemaglutininas, para as quais estes testes podem ser utilizadas como diagnóstico?

PRÁTICA: REAÇÃO DE NEUTRALIZAÇÃO

Introdução: Uma partícula viral, após combinação com o anticorpo específico, fica "neutralizada", isto é, torna-se não infecciosa. Isso ocorre pelo bloqueio das estruturas externas necessárias no processo de adsorção à membrana celular da célula hospedeira ou pelo bloqueio da desmontagem do capsídeo viral. Nesta técnica, soro e vírus são misturados, incubados em condições apropriadas para que haja reação, sendo a mistura posteriormente inoculada em culturas celulares ou animais de laboratório. Se os anticorpos presentes no soro forem específicos para o vírus, este será neutralizado e não ocorrerá infecção das células. No entanto, se os anticorpos não forem específicos, o vírus continuará infectivo e será observado efeito citopático nas culturas celulares e doença, ou morte nos animais de laboratório.

A reação de neutralização em culturas celulares tem grande utilidade no diagnóstico de laboratório das infecções virais. Pode ser usada para identificar uma amostra de vírus isolado ou para a dosagem de anticorpos neutralizantes no soro de um paciente. Na reação de neutralização para identificação de um dado vírus, utilizam-se soros-padrão hiperimunes preparados em coelhos ou outros animais. O soro específico, que é capaz de neutralizar o vírus isolado, é considerado homólogo ao vírus, e o identifica. Alguns vírus são biologicamente semelhantes, mas têm composições antigênicas diferentes, constituindo-se em tipos antigênicos de um mesmo vírus, ou sorotipos. Assim, por exemplo, existem 7 tipos antigênicos do adenovírus, que causam infecções respiratórias agudas. Se a amostra de vírus isolado de um paciente, pelas características do efeito citopático for considerado como adenovírus, podemos, através da neutralização, utilizando soros padrões tipo específicos, saber a que tipo pertence essa amostra, isto é, determinar qual o sorotipo do vírus.

A reação de neutralização também pode ser feita para a dosagem de anticorpos no soro de pacientes, utilizando para isto vírus padrões conhecidos, mantidos em laboratório. Por meio da neutralização pode-se verificar para quais vírus o paciente tem imunidade, ou se está respondendo satisfatoriamente a uma infecção. Se fizermos uma série de diluições do soro do paciente e executarmos a reação de neutralização com cada diluição, podemos dosar a quantidade de anticorpos. Esta reação tem grande utilidade no diagnóstico das doenças virais.

Exercício prático:

Uma criança de 18 meses de idade foi hospitalizada com febre alta, conjuntivite, secreção nasal e tosse. Em alguns dias o quadro clínico evoluiu para bronquiolite e a paciente necessitou assistência respiratória.

No dia seguinte à internação foi colhida uma amostra de lavado de nasofaringe. A amostra foi diluída em solução salina e foi inoculada em cultura de células HEp2 (carcinoma humano de laringe). Após 48 h, foi observado um efeito citopático (ECP) caracterizado por arredondamento das células, formação de cachos e formação de corpúsculo de inclusão nuclear, sugestivo de adenovírus. Foi colhido o sobrenadante da cultura com efeito citopático positivo e congelado para posterior caracterização do vírus.

Titulação do vírus isolado (sobrenadante da cultura celular com ECP positivo):

1. O vírus isolado foi diluído, em solução salina tamponada, na base 10, de 10^{-1} até 10^{-6} .
2. Culturas de células HEp2 foram preparadas em tubos, cultivadas em Meio Mínimo de Eagle com 10% de soro fetal bovino (MEM -10%SFB). Assim que apresentaram confluência, isto é, um tapete de células uniforme, o meio de cultura foi trocado para meio de manutenção MEM 2 SFB. Cada uma das diluições do vírus foi inoculada em dois tubos de cultura e estes incubados à 37°C por 4 dias.
3. Duas culturas de células HEp2 foram mantidas sem inocular, para controle de células
4. Após 48 e 96 horas de incubação a 37°C, as culturas foram observadas ao microscópio e anotados quais tubos apresentaram efeito citopático.

A) Leitura da titulação

Diluição do vírus	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	Cont.
Titulação da amostra clínica	++++	++++	+++	+	neg	neg	neg
	++++	+++	++	++	neg	neg	neg

B) Definição:

• **Título:** É o inverso da maior diluição do material capaz de causar o efeito em estudo.

Como no caso observamos o efeito citopático (ECP) do vírus nas culturas celular, o título é definido Doses infectantes em cultura de tecido (DICT). A diluição na qual ainda foi observado o efeito citopático, correspondente àquela que contém 1 DICT por volume inoculado. No exemplo 1 DICT em 100µL. O título corresponde ao inverso da maior diluição onde ainda se observou o efeito citopático. Portanto, se na diluição 10⁻⁴ foi observado ECP, esta contém 1 DICT por 100µL. O título da amostra original é de 10⁴ DICT por 100µL.

É importante titular o vírus isolado, antes de proceder à neutralização, para que não haja a chance de usar excesso de vírus o que dificultaria a observação da neutralização pelos anticorpos.

Na reação de neutralização de adenovírus, utilizamos 10 DICT de vírus em cada tubo. Portanto, de modo a ter 10 DICT a amostra original foi diluída 10⁻³ vezes.

2.3) REAÇÃO DE NEUTRALIZAÇÃO PARA TIPAGEM DO VÍRUS ISOLADO:

A) Material:

1. Um tubo contendo a amostra de vírus isolado, titulado e diluído 10⁻³ vezes de forma a conter 10 doses infectantes (10 DICT/100µl).
 2. Tubos contendo soros-padrão anti-adenovírus, isto é, soros de coelhos que têm anticorpos contra os adenovirus do tipo 3, 5 e 7, diluídos de modo a conter 100 unidades neutralizantes. Um tubo com soro normal de coelho. Um tubo com salina tamponada.
 3. Dois tubos de cultura de células HEP. Estas culturas foram preparadas em MEM -10 % SFB. Após 72 horas, isto é, após a confluência das células, o meio de cultivo foi trocado para MEM com 2 % de SFB.
- Três pipetas tipo pasteur estéreis.

B) Procedimento:

1. Ligar o gás. Trabalhar o tempo todo com assepsia.
2. Com uma pipeta pasteur, transferir o soro padrão (todo o conteúdo = 300 µL) para o tubo que contem o vírus (300 µL).
3. Fechar o tubo e misturar, delicadamente, o vírus com o soro.
4. Incubar a reação antígeno-anticorpo a 37°C centígrados por 15 minutos.
5. Com o auxílio de outra pipeta tipo pasteur, inocular 200µL (4 gotas) em um dos tubos de cultivo.
6. Deixar o outro tubo de cultivo para controle de células.

C) Divisão do material por grupos:

- Grupos 1, 6, 11 e 16 – vírus isolado e soro anti-adenovírus 3.
- Grupos 2, 7, 12 e 17 – vírus isolado e soro anti-adenovírus 5.
- Grupos 3, 8, 13 e 18 – vírus isolado e soro anti-adenovírus 7.
- Grupos 4, 9, 14 e 19 – vírus isolado e soro normal de coelho.

▪ Grupos 5,10,15 e 20 – vírus isolado e salina tamponada.

D) Protocolo para leitura:

tubos	inoculado		controle	
Vírus isolado (10 DICT)+ soro anti-adenovirus 3				
Vírus isolado (10 DICT)+ soro anti-adenovirus 5				
Vírus isolado (10 DICT)+ soro anti-adenovirus 7				
Vírus isolado (10 DICT) + soro normal de coelho				
Vírus isolado (10 DICT) + salina tamponada				

QUESTÕES PARA ESTUDO

1. Quais os resultados obtidos pelo seu grupo e pelos demais grupos da classe?
Marque no Quadro acima estes resultados.
2. Qual o soro padrão que neutralizou o efeito citopático do vírus?
3. Qual o tipo sorológico do vírus isolado?
4. Qual a finalidade da utilização de soro normal de coelho?
5. Qual a importância de se determinar o sorotipo de um vírus?
6. O que é um anticorpo neutralizante?

PRÁTICA: Diagnóstico rápido das viroses - Ensaio Imunoenzimático e Western-blot:

Introdução

Os métodos de diagnóstico laboratorial para identificação de vírus podem ser classificados em “clássicos” e “rápidos”. Os métodos clássicos são baseados no isolamento de vírus em sistemas celulares, seguido de tipagem dos vírus por antissoros específicos. A identificação de um vírus pelos métodos clássicos leva no mínimo duas semanas, quando não meses. Estes métodos são muito importantes para a pesquisa, ou para estudos epidemiológicos, mas têm pouca utilidade no diagnóstico clínico.

Os métodos de diagnóstico rápido são importantes em situações nas quais a etiologia de uma doença viral deve ser determinada com rapidez e precisão, para a intervenção imediata do clínico, ou na prevenção de doenças, como na triagem de sangue para reposição. Apresentam grande utilidade na identificação de infecções por vírus que não podem ser facilmente cultivados, como por exemplo os vírus da hepatite. A hepatite B, HIV, rotavírus, entre outros. No diagnóstico rápido, vírus, antígenos virais, anticorpos do tipo IgM ou IgG são detectados diretamente em amostras provenientes dos pacientes.

A microscopia eletrônica foi a primeira técnica a ser aplicada no diagnóstico rápido dos vírus. É importante para o estabelecimento da etiologia de várias doenças, entre elas a varíola que, apesar de erradicada, ainda deve ser tratada como uma emergência virológica em casos suspeitos, devido à sua alta taxa de contágio. É uma técnica utilizada na identificação de uma série de vírus causadores de gastroenterites infantis, como os rotavírus e adenovírus, que são de difícil cultivo. As principais limitações da microscopia eletrônica são: a disponibilidade do microscópio, aparelho caro e só existente em centros mais especializados e a dificuldade em se examinar um grande número de amostras.

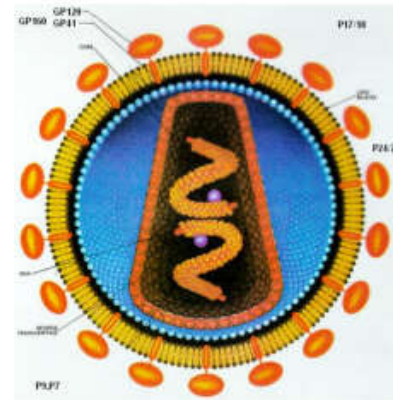
Existem diversas técnicas laboratoriais que podem ser utilizadas no diagnóstico rápido das viroses. Entre elas podemos citar: a reação de fixação do complemento, a aglutinação de partículas de látex, a hemaglutinação, a reação de imunofluorescência, o radioensaio, os ensaios imunoenzimáticos e mais recentemente, a reação de PCR.

As técnicas mais utilizadas são:

- a reação de hemaglutinação: aplicada no diagnóstico de vírus do sarampo, da rubéola, da influenza, etc., ou para a detecção de anticorpos contra estes vírus;
- o ensaio imunoenzimático: utilizado para detecção de antígenos virais ou anticorpos contra hepatites, rotavírus, adenovírus, citomegalovírus, HIV, etc.
- a PCR: importante na determinação da carga viral do HIV, mas tem sido padronizada para a detecção de inúmeros vírus.

1.1) Diagnóstico laboratorial para HIV:

O HIV é um vírus da família Retroviridae, gênero Lentivirus. A partícula viral é esférica, envelopada, medindo de 80 a 100 nm de diâmetro. O core interno tem morfologia icosaédrica, sendo constituído pelo cápside, em forma de cone, e pela matriz, de morfologia esférica. O cápside é formado pela proteína p24 e abriga o genoma viral. A matriz é formada pela proteína p17. O genoma viral é constituído por duas cópias de RNA de fita simples, de polaridade positiva. A cada fita de RNA encontra-se associada à transcriptase reversa (RT 66 kDa) e a integrase (IN – 32kDa). O genoma viral encontra-se recoberto pela proteína de nucleocápside (p7). O capsídeo abriga, ainda, a protease (p11). O envoltório lipoprotéico apresenta duas proteínas glicosiladas, sendo a mais externa a gp120, utilizada no reconhecimento do receptor e a mais interna a gp41, uma proteína transmembrana que atua como proteína de fusão. A antigenicidade destas proteínas permite o diagnóstico da infecção baseado na procura dos anticorpos específicos contra o vírus, seja por ensaio imunoenzimático ou através da reação de western-blot. A resposta imune varia de acordo com a carga viral ou a imunocompetência do hospedeiro.



O diagnóstico da infecção por HIV é mais frequentemente realizado pela detecção do anticorpo específico presente no soro do paciente. O ensaio imunoenzimático (ELISA-“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”) é utilizado para a triagem de rotina. Detecta anticorpos contra uma ou mais proteínas virais, mas pode fornecer resultados falso-positivos. Todo resultado positivo pelo ELISA precisa ser confirmado por um ensaio mais específico, como a reação de Western-blot, que determina os anticorpos específicos contra cada uma das proteínas virais. As chamadas ELISAS de 4ª geração detectam anticorpos anti-HIV e proteínas do HIV e proporcionam uma detecção mais precoce da soro-conversão, reduzindo o período da janela imunológica, e diminuindo a ocorrência de resultados falso positivos.

Exercícios:

2.1) Determinação de anticorpos anti-HIV através do ensaio imunoenzimático:

Observação importante: Esta aula é uma simulação dos testes utilizados em rotina e NENHUM material infeccioso será manipulado. Entretanto deve-se tomar CUIDADO ao manipular alguns dos reagentes (OPD-ortofenildiamina e o ácido sulfúrico 2M) usados durante o experimento.

1. Uma microplaca foi sensibilizada com uma mistura de antígenos de HIV: proteínas p24 e gp160 (precursora da gp120 e da gp41) purificadas, obtidas a partir de vírus cultivados em células. Esta mistura de antígenos virais foi distribuída nas fileiras A, C, E e G da placa.

2. Como controle de especificidade foram colocados antígenos celulares, obtidos de células não infectadas, nas fileiras B, D, F e H.

3. As amostras de soro dos pacientes (301 a 306), bem como as amostras de soro controle positivo e soro negativo foram adicionadas, em duplicata, às cavidades contendo antígenos virais, assim como, às cavidades controle celular (100 µL por cavidade), utilizando para cada amostra 4 cavidades, conforme o esquema da placa abaixo.

4. A microplaca foi incubada por 90 min. a 37°C.

5. A seguir, a placa foi lavada, por 3 vezes, com tampão fosfato (PBS-Tween 20).

6. Para detectar a presença dos anticorpos, foram adicionados a cada cavidade 100 µl de soro de cabra anti-IgG humana, conjugado à peroxidase.

7. A microplaca foi incubada por 60 min. a 37°C.

8. A seguir, a placa foi lavada, por 3 vezes, com tampão fosfato.

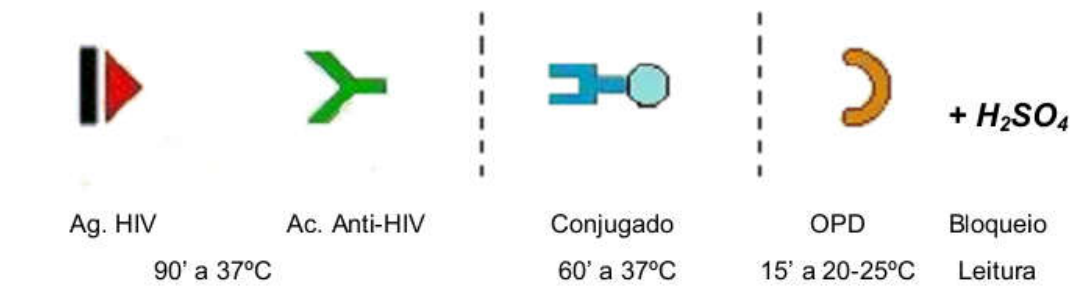
Etapas a serem executadas durante a aula:

9. Adicionar a mistura substrato + cromógeno, água oxigenada + OPD (ortofenilenodiamina) no volume de 100 µl (2 gotas) por cavidade utilizada.

10. Incubar à temperatura ambiente até o desenvolvimento de coloração amarela nos controles positivos.
11. Para parar a reação, adicionar 50 µl (1 gota) de ácido sulfúrico 2M a cada cavidade.
12. São consideradas positivas as amostras que apresentarem coloração amarelo-marrom.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	controle positivo		303									
B												
C	controle negativo		304									
D												
E	301		305									
F												
G	302		306									
H												

Princípio do teste: sanduíche indireto ELISA:

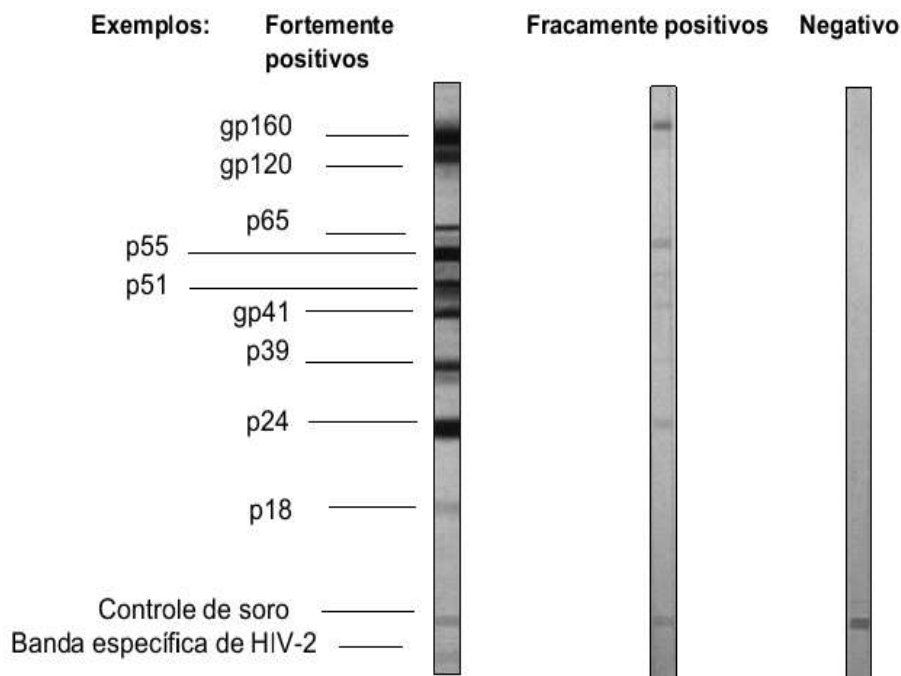


2.2) Determinação de anticorpos anti-HIV através da reação de Western-blot (Demonstração):

A técnica de Western blot tem sido utilizada na caracterização do perfil antigênico do HIV e na descrição da resposta imune para este vírus em pessoas expostas ou infectadas. Devido a seu alto custo, mas grande sensibilidade é comumente utilizada apenas como teste confirmatório, sendo o ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizado rotineiramente como teste de triagem. O princípio da reação é o mesmo do ensaio imunoenzimático, mas na reação Western-blot as proteínas virais são separadas pelo sua massa (kDa) em tiras de nitrocelulose. O preparo destas fitas, contendo as proteínas virais, é feito pelas indústrias produtoras de kits de diagnóstico. No laboratório clínico a reação é feita a partir da adição do soro do paciente.

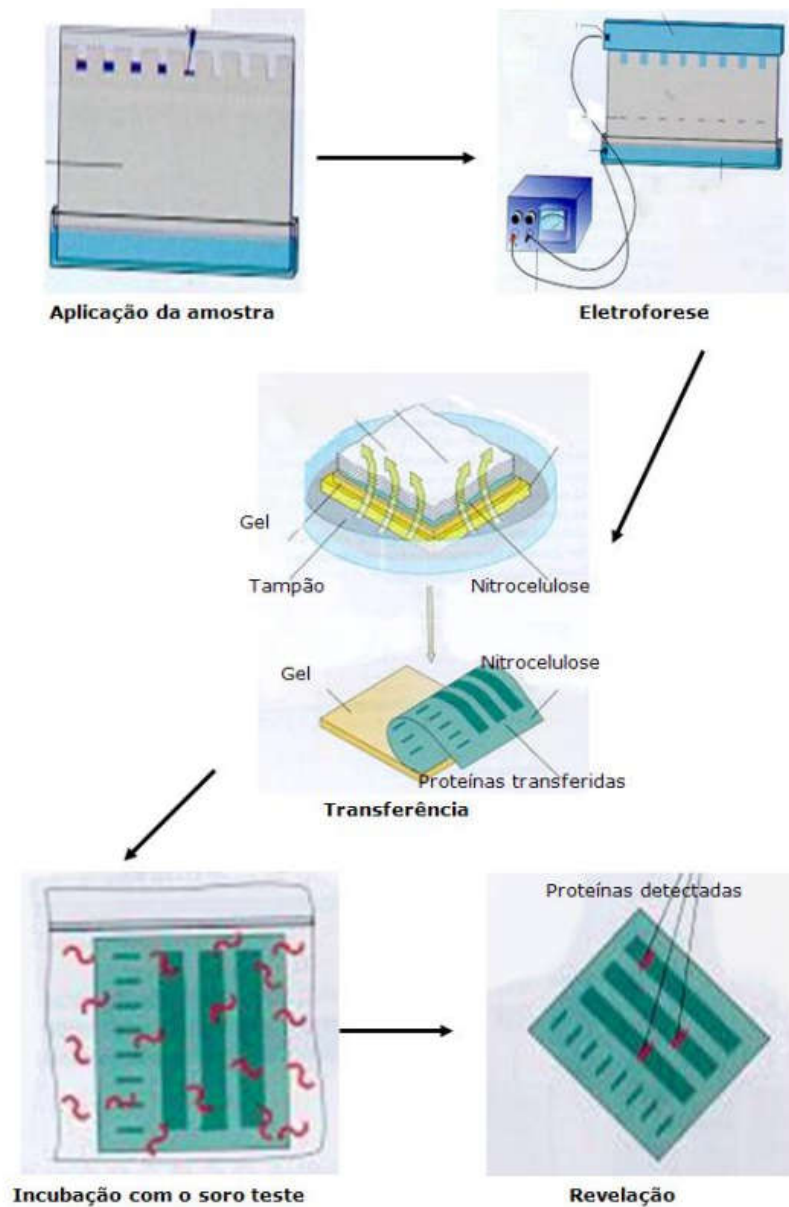
1. O HIV é cultivado da linhagem celular H9 de linfócitos T. O vírus parcialmente purificado é inativado por tratamento com psoralen e luz ultravioleta e rompido pela ação de detergente.
2. Os extratos proteicos são aplicados num gel de SDS-poliacrilamida.
3. As proteínas virais são separadas de acordo com o peso molecular, através de eletroforese.
4. As proteínas são transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose ou nylon, em cuba de transferência, por aplicação de uma corrente elétrica.

5. A membrana é então lavada, bloqueada (com proteínas, ex: leite, para minimizar a ligação inespecífica de imunoglobulinas), cortada em fitas e acondicionada.
No momento do teste:
6. Para cada amostra de soro é utilizada uma fita em separado. As fitas de nitrocelulose são incubadas na presença do soro ou plasma dos pacientes, assim como, com os soros controles, por 2 h a 37°C.
7. A seguir, as fitas são lavadas, por 3 vezes, com tampão fosfato (PBS-Tween 20).
8. Para detectar a presença dos anticorpos, é adicionado soro detector: soro de cabra anti IgG humana, conjugado à peroxidase e as fitas são incubadas por 30 min. a 37°C, e lavadas.
9. A reação é revelada com solução de substrato: tampão citrato contendo H₂O₂ e 4-cloro-1-naftol (cromógeno), por 10 a 15 minutos à temperatura ambiente, e lavadas com água.
10. Para leitura da reação é feita análise das bandas proteicas reveladas, e a presença ou ausência de anticorpos para HIV é determinada pela comparação de cada fita de nitrocelulose teste com os padrões de bandas dos controles positivos. Cada banda visualizada na fita teste deve ser relacionada com um peso molecular das proteínas virais, baseando-se em sua posição e por comparação com a fita contendo o controle positivo altamente reativo (forte).
Resultados do Western-blot:



Padrão observado	Resultado
Nenhuma banda presente	Negativo.
Uma bandas presente em gp41 ou gp120/160, e a banda p24 presente. Normalmente gp 120/160 e gp 41 apresentam-se difusas.	Positivo para HIV-1.
Bandas presentes com padrão diferente do esperado.	Indeterminado.

Representação esquemática da reação de Western-blot



QUESTÕES PARA ESTUDO

Parte 1:

1. No ELISA quais os resultados obtidos para os controles positivos e negativos?
2. Qual o resultado obtido para as 6 amostras testadas?
3. Considerando estes resultados quais as amostras que deverão ser submetidas a testes confirmatórios (Western-blot)?

Parte 2.

1. Quais os diagnósticos finais das amostras analisadas?

MICOLOGIA

PRÁTICA: ISOLAMENTO DE FUNGOS DO MEIO AMBIENTE

INTRODUÇÃO

Os fungos tem como habitat, os mais diferentes substratos. A grande maioria dos fungos vive no solo fazendo parte da reciclagem dos materiais na natureza. São encontrados também nos vegetais, água, nos animais, etc. Os fungos formam diversas estruturas de dispersão, sendo a principal, os esporos, e através de dispositivos especiais, essas estruturas entram em contato com várias vias de dispersão.

A principal via de dispersão é o ar atmosférico, através dos ventos. Os fungos que se dispersam pelo ar atmosférico são denominados de fungos anemófilos e tem importância em alergias no homem e como agentes deteriorantes de diversos materiais. Os fungos podem se dispersar também pela água, sementes, insetos, homem, animais, etc.

Pelas vias de dispersão, os fungos são espalhados na natureza. Quando encontram um substrato com nutrientes adequados, crescem e colonizam. Dessa maneira, podem deteriorar vários materiais e ocasionar em vários hospedeiros, as micoses.

Através de métodos específicos, os fungos podem ser isolados de seu habitat, das vias de dispersão, dos vários materiais contaminados e de diversos hospedeiros com micoses.

MATERIAL

Placas de Petri com agar Sabouraud para isolamento de fungos anemófilos
Placas de Petri com agar Sabouraud para isolamento de fungos da água.
Placas de Petri com agar batata para isolamento de fungos de substratos alimentares.
Placas de Petri com terra para isolamento de dermatófitos
Pelos estéreis
Tubos com suspensão de alimentos (ração).
Tubos de 20 ml estéreis
Tubos com água destilada estéril
Pipetas de 1 ml estéreis.

ISOLAMENTO DE FUNGOS ANEMÓFILOS

Expor placas de Petri, contendo ágar Sabouraud dextrose durante 15 minutos em diferentes locais. Cultivar à temperatura ambiente. Após 4 dias realizar a contagem de colônias crescidas e iniciar a identificação das mesmas.

ISOLAMENTO DE FUNGOS DE LÍQUIDOS.

Para o isolamento de fungos que utilizam a água como via de dispersão, utiliza-se técnicas de diluição comuns e semeadura em agar Sabouraud. Para o isolamento de fungos aquáticos, as técnicas são específicas.

Coletar água do bebedouro, da torneira ou de outro local. Semear 1 ml do líquido em agar Sabouraud. Espalhar com alça de platina e cultivar à temperatura ambiente. Após 4 dias realizar a contagem de colônias crescidas e iniciar a identificação das mesmas. Em alguns casos é necessário proceder à diluição da água e semear pela técnica de "pour plate".

ISOLAMENTO DE DERMATÓFITOS DO SOLO (Método de Vanbreuseghen).

Esta técnica permite-nos conhecer a biologia dos dermatófitos, seus ciclos evolutivos e sua ocorrência em determinada região. Os dermatófitos têm a capacidade de crescer em queratina e, devido a este fato, utilizamos pêlos e outro material que a contenha, como isca para "pescar" o dermatófito.

Colocar uma quantidade de terra em placa de Petri estéril. Espalhar os pêlos sobre a superfície da terra. Umedecer com água estéril. Fechar e identificar a placa. Deixar à temperatura ambiente, observando-a periodicamente. Após crescimento de micélio branco penugento ao redor dos pêlos, examina-los entre lâmina e lamínula com uma gota de lactofenol azul algodão. Desenhar as estruturas características.

ISOLAMENTO DE FUNGOS DE SUBSTRATOS ALIMENTARES.

Fazer uma suspensão do substrato em água destilada estéril (g/ml). Fazer uma diluição seriada e semear pela técnica "pour plate" em agar batata acidificado. O material será entregue numa diluição adequada e a semeadura será realizada em superfície do ágar.

1-

PRÁTICA: MORFOLOGIA MACRO E MICROSCÓPICA DOS FUNGOS

Morfologia de fungos

Introdução

Os fungos podem ser identificados pela sua morfologia macroscópica e microscópica. Macroscopicamente os fungos podem apresentar vários tipos morfológicos com colônias filamentosas, cotonosas, pulverulentas e outras (bolores) e cremosas (leveduras) e com os mais diversos tipos de pigmentos.

Microscopicamente podem se apresentar como organismos unicelulares, as leveduras, ou na forma de hifas, a unidade estrutural básica dos bolores. O conjunto de hifas define o micélio. O micélio pode ser diferenciado em vegetativo, quando exerce as funções de assimilação de alimentos, e micélio de frutificação que serve à reprodução.

Podem ter como habitat os mais diferentes substratos. A maioria dos fungos vive no solo fazendo parte da reciclagem dos materiais na natureza formando diversas estruturas de dispersão.

A principal via de dispersão é o ar atmosférico, através dos ventos. Os fungos que se dispersam pelo ar atmosférico são denominados de fungos anemófilos e tem importância em alergias no homem e como agentes deteriorantes de diversos materiais.

Pelas vias de dispersão, os fungos são espalhados na natureza. Quando encontram um substrato com nutrientes adequados, crescem e colonizam. Dessa maneira, podem deteriorar vários materiais e ocasionar em vários hospedeiros, as micoses.

Micélio vegetativo

De acordo com a morfologia, apresenta 3 tipos:

Unicelular: Células arredondadas, ovóides ou alongadas, e se reproduzem principalmente por brotamento. Caracteriza as leveduras.

Filamentoso: Pode se apresentar com ou sem septos. As hifas podem se diferenciar em estruturas variadas, recebendo denominações diversas: rizóides, artrósporadas, anastomoses, etc. Caracteriza os bolores.

Pseudofilamentoso: Algumas leveduras em determinadas condições formam, por brotamentos sucessivos, uma estrutura filamentosa conhecida com o nome de pseudomicélio. Caracteriza as leveduras do gênero *Candida*.

Micélio reprodutivo:

O micélio vegetativo se diferencia em estruturas de reprodução caracterizadas pela formação de conídios que cumprem as funções de disseminação da espécie. Os conídios podem ser hialinos, pigmentados, simples, septados, apresentando várias formas que muitas vezes definem gêneros ou espécies de fungos. São muito importantes na identificação dos fungos. Os conídios, de acordo com sua origem, podem ser assexuados ou sexuados e tanto um com outro, podem estar ou não dentro de determinadas estruturas.

Esporos assexuados:

Ectósporos: formam-se na extremidade de hifas especiais denominadas conidióforos.
Ex: *Aspergillus*, *Penicillium*.

Endósporos: esporos produzidos no interior de esporângios. Os esporos, nesse caso são chamados de esporangiósporos e caracterizam os zigomicetos. Ex. *Rhizopus*, *Mucor*.

Esporos sexuados:

Ectósporos: esporos formados na extremidade de basídios e são denominados basidiósporos. Caracterizam a subdivisão Basidiomycotina. Ex. cogumelos.

Endósporos: esporos formados no interior de células denominadas ascos. Os esporos são chamados de ascósporos e caracterizam a subdivisão Ascomycotina. Ex. *Piedraia hortai*.

Material

Culturas de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Candida*

Lâminas prontas de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Candida*.

Placas de ágar Sabouraud
Placas para cultivo em lâmina e Placas para cultivo em lâmina-leveduras
Lâminas, laminulas, corante lactofenol azul-algodão, alças em L
Tubos com solução fisiológica.

Morfologia macroscópica

Descreva os principais aspectos macroscópicos característicos: tipo de colônia, verso, reverso, pigmentação, etc. Observe a diferença entre levedura e bolor.

Obtenção de colônia gigante.

Com alça de platina em L, retire um pequeno fragmento da colônia do tubo e coloque no centro de uma placa de Petri com ágar Sabouraud. Descreva os aspectos morfológicos macroscópicos característicos da colônia após ~ 7 dias de cultivo.

Morfologia microscópica

Descreva, através de lâminas prontas, os principais aspectos microscópicos dos fungos em questão.

<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Rhizopus</i>	<i>Candida</i>

Microcultivo de bolores.

Utilizar placas de Petri contendo lâminas dispostas sobre papel de filtro e um pequeno cubo (1 cm³) de meio de cultura, sobre uma das lâminas. Com alça de platina, retire um pequeno fragmento de um bolor e semeie os lados do ágar. Coloque uma lamínula estéril sobre o ágar e água destilada estéril na placa para evitar dessecação do meio. Feche a placa e deixe à temperatura ambiente. Quando houver desenvolvimento satisfatório, retire a lamínula e o fragmento do meio de cultura. Coloque numa lâmina, uma gota de lactofenol azul algodão e a lamínula em cima. Examine ao microscópico e tente identificar. Faça desenho das estruturas microscópicas observadas.

QUESTÕES PARA ESTUDO

- 2- Como foram realizados os experimentos de aula?
- 3- Que materiais foram utilizados?

QUESTÕES PARA ESTUDO

1 Como foram realizados os experimentos de aula?

2 Que materiais foram utilizados?

3 Quais eram os objetivos dos experimentos? Descreva e esquematize as diferenças macro e microscópicas entre bolores e leveduras

PRÁTICA: ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE MICOSES SUPERFICIAIS E CUTÂNEAS

Micoses superficiais e dermatofitoses

1) Pitiríase versicolor:

→ Agente etiológico: *Malassezia furfur* (Baillon, 1889).

→ Características clínicas: Lesões superficiais, atingindo principalmente o tronco e abdômen. As lesões se apresentam sob a forma de manchas hipocrômicas descamativas irregulares, de cor variável. Apresenta fluorescência à luz de Wood.

→ Diagnóstico micológico: as escamas devem ser clarificadas em KOH a 20% ou 30%.

Ao exame microscópico observam-se células arredondadas, isoladas ou agrupadas como um cacho de uvas ao lado de hifas curtas, septadas e ramificadas.

2) Dermatofitoses:

Infecções cutâneas, com uma variedade de aspectos clínicos, cujos agentes etiológicos utilizam a queratina da pele, pelos e unhas como substrato. A infecção é geralmente restrita às camadas não vivas da superfície corpórea. A maioria destas infecções é causada por um grupo homogêneo de fungos queratinofílicos chamados dermatófitos.

Os dermatófitos são divididos em gêneros, segundo a forma de reprodução:

Assexuada:

- *Microsporum sp*
- *Trichophyton sp*
- *Epidermophyton sp*

Sexuada:

- *Arthroderma sp*

Quanto ao habitat os dermatófitos podem ser:

- Geofílicos - quando têm seu habitat no solo.
- Antropofílicos - quando têm seu habitat no homem.
- Zoofílicos - quando têm seu habitat nos animais.

→ Modo de infecção:

A infecção é feita pela forma miceliana. Na pele, os filamentos micelianos crescem excentricamente na camada córnea da pele e se ramificam. Após espaço de uma semana há uma reação cutânea e formação de vesículas ao redor da lesão. O pêlo é penetrado secundariamente; o dermatófito vai utilizando a queratina do pêlo e penetrando em direção ao bulbo. Os cabelos parasitados tornam-se descoloridos, frágeis, e caem aparecendo uma zona de tonsura (tinhas tonsurantes).

O aspecto dos elementos fúngicos dentro e no redor dos pêlos e a presença de hifas septadas, ramificadas, com arthroconídeos nas escamas de pele e unhas, indicam seguramente uma infecção por dermatófitos.

→ Aspectos clínicos das dermatofitoses:

Dependendo do local onde o dermatófito se instale, podemos denominar a dermatofitose, por exemplo, na região inguino-crural=tinea cruris; no corpo= tinea corporis; na barba= tinea barbae; na mãos= tinea manum; nos pés= tinea pedis, na unha= tinea unguium; no couro cabeludo= tinea capitis.

→ Estudo biológico dos dermatófitos:

Podemos utilizar a lâmpada de Wood, não só para o auxílio diagnóstico, como para controle de cura. As lesões de tinhas submetidas às radiações ultravioletas, filtradas, apresentam fluorescência verde, principalmente nas lesões de tinha do couro cabeludo provocadas pelo *M. canis*.

QUESTÕES PARA ESTUDO

Diferencie:

- a) Tricosporia de Microsporia;
- b) *Microsporum canis* de *Microsporum gypseum*
- c) *Malassezia furfur* em vida parasitária e saprofítica
- d) Dermatófitos em vida parasitária na pele e em cultura.

PRÁTICA: IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDUROSES

Leveduroses

Candidíase: Candidose ou Candidíase é uma infecção primária ou secundária envolvendo as espécies do gênero *Candida*. Pode-se considerar cerca de 7 espécies patogênicas para o homem: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*. As manifestações clínicas das doenças são as mais variadas, podendo ser subaguda, aguda ou crônica. O envolvimento pode ser localizado na boca, garganta, couro cabeludo, vagina, dedos, unhas, brônquios, pulmões, trato gastrointestinal ou generalizado, como na septicemia, endocardite e meningite.

Os processos patológicos também são variados indo desde irritação e inflamação até uma resposta granulomatosa e supurativa. *C. albicans* é uma levedura presente na microbiota residente, assim para que seja considerada patogênica é necessário que a mesma seja isolada de modo constante, em grande quantidade das lesões e, de modo geral, visualizada ao exame direto na forma filamentosa.

Frequentemente, o paciente apresenta debilitação em seus mecanismos de defesa ou tem uma doença de base. Pacientes idosos debilitados e recém-nascidos prematuros a ocorrência de candidíase é alta, em suas variadas formas clínicas. Durante a gravidez, principalmente nos 3 últimos meses, com o aumento de glicogênio nas células da mucosa vaginal, ocorre aumento de candidíase vaginal. Tratamentos prolongados com antibióticos, principalmente os chamados de largo espectro de ação, corticóides, drogas antilábicas e os anticoncepcionais favorecem a instalação de candidíase.

Um dos principais fatores locais para a instalação de candidíase é umidade. Assim, lavadeiras, cozinheiras, faxineiras, estando muito em contato com água e sabão, são acometidas pela colonização do fungo, principalmente nos sulcos ou dobras cutâneas. A maceração da pele por fatores mecânicos ou químicos favorece o crescimento do fungo.

Criptococose: É uma infecção subaguda ou crônica de comprometimento pulmonar, sistêmico e, principalmente, do sistema nervoso central, causada por *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gatti*. A infecção primária no homem é quase sempre pulmonar, devido à inalação do fungo da natureza. A infecção pulmonar é quase sempre subclínica e transitória, podendo imergir ao lado de outras doenças que debilitam o indivíduo, tornando-se rapidamente sistêmica e fatal. Portanto, é conhecida como infecção oportunista. Este fungo tem tropismo pelo SNC, ocasionando meningite criptocócica. A presença de uma cápsula mucopolissacarídica diferencia claramente as espécies de *Cryptococcus* virulentas de outras leveduras. Essa cápsula é facilmente percebida após coloração do material clínico (comumente líquor) com tinta nanquim que é incapaz de ultrapassar a cápsula e assim tingir a célula de levedura.

C. neoformans é de distribuição cosmopolita e está associado com habitat de aves, principalmente pombos. O fungo vive nas fezes das aves e pode permanecer viável por 2 anos se houver umidade suficiente. A porta de entrada é através da via respiratória levando a uma infecção pulmonar primária que pode ser inaparente. Então o fungo pode permanecer viável por anos até haver alguma alteração na resistência do hospedeiro, quando então se manifesta a doença no pulmão, no SNC ou disseminada.

C. gatti é mais frequentemente encontrado nas cascas de árvores, como eucalipto, atingindo principalmente silvicultores. O desenvolvimento no hospedeiro é similar a *C. neoformans*.

1- Montagem de Lâminas –

a) Diferenciar material colhido da mucosa oral de amostra de líquor corada com tinta nanquim – identificar possíveis agentes patogênicos.

2- Microcultivo de leveduras

Utilizar placas de Petri contendo lâminas dispostas sobre um bastão de vidro. Com todo cuidado de assepsia, coloque um ml de cornmeal agar + Tween 80 (fundido), sobre a lâmina. Com alça de platina, retire um pequeno fragmento da colônia de levedura e semeie em estria. Coloque uma lamínula estéril sobre o ágar e água destilada estéril na placa para evitar dessecação do meio. Feche a placa e deixe à temperatura ambiente. Quando houver desenvolvimento satisfatório, submeta à ação do formol (0,5 ml durante 1 hora). Examine ao microscópico. Faça desenho:

3 – Auxanograma

O auxanograma baseia-se nas diferentes capacidades de assimilação para fontes de carbono e nitrogênio entre as espécies de leveduras. Para o teste de assimilação de carbono será realizada a diferenciação entre glicose e lactose. Para nitrogênio: nitrato de potássio e peptona (nitrogênio orgânico) . Meios de cultura sem fonte de carbono (Meio C) ou sem fonte de nitrogênio (Meio N) serão mantidos a 60°C até o início do experimento, para então serem esfriados até temperatura confortável para as mãos e derramados sobre uma placa de petri contendo uma suspensão de *Candida*. Meio de cultura e suspensão deverão ser homogenizados cuidadosamente e após a sua solidificação será adiciona uma pequena quantidade (uma pitada) de cada nutriente a ser testado.

4- Demonstrações e lâminas focalizadas:

Roteiro:

- 1- Finalidade dos testes: urease, tubo germinativo e zimograma.
- 2- Diferencie aspectos macroscópios e microscópios entre *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*.

QUESTÕES PARA ESTUDO

- 1- Diferencie: Auxanograma, Zimograma, Prova Urease, Tubo germinativo.

PRÁTICA: IDENTIFICAÇÃO DE *Sporothrix schenckii*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum*

Fungos dimórficos

Importantes fungos patogênicos apresentam dimorfismo térmico. Esses fungos a temperatura ambiente apresentam-se sob a forma de bolores (fase M “mould”) enquanto que no hospedeiro encontram-se sob a forma de leveduras (fase Y “yeast”). Portanto pode-se dizer que em vida saprofítica os fungos com dimorfismo térmico são bolores, e na vida parasitária são leveduras, e o contágio se dá através da inalação/inoculação da forma micelial.

Estão apresentados na aula três exemplos de fungos com dimorfismo térmico:

- a) *Paracoccidioides brasiliensis*
- b) *Histoplasma capsulatum*
- c) *Sporothrix schenckii*

Através da observação das lâminas, pranchas demonstrativas e colônias em cultura represente cada um desses fungos em sua vida saprofítica e parasitária

<i>P. brasiliensis</i> – vida saprofítica	<i>P. brasiliensis</i> – vida parasitária
<i>H. capsulatum</i> – vida saprofítica	<i>H. capsulatum</i> – vida parasitária
<i>Sporothrix schenckii</i> – vida saprofítica	<i>S. schenckii</i> – vida parasitária

Identifique o modo de vida saprofítico de cada um deles, forma de contágio, e desenvolvimento.

Suporte Teórico ao material demonstrado nas lâminas, pranchas e culturas.

1) Paracoccidioidomicose:

P.brasiliensis é um fungo dimórfico, agente da Paracoccidioidomicose, doença de localização sistêmica, grave e que se manifesta por diversas formas clínicas.

O exame direto a fresco é de grande valor no diagnóstico dessa micose, pois o fungo apresenta-se sob a forma de levedura com dupla membrana, sendo a interna enrugada e a externa lisa. Dependendo do material, apresenta-se com brotamentos múltiplos. Em material de biópsia, com coloração de Gomory, pode-se observar facilmente o aspecto característico de “roda de leme”.

O cultivo pode ser feito em ágar Sabouraud a 25°C. A 25°C, a cultura está em fase M (mould-bolor) e observa-se o desenvolvimento de uma colônia cotonosa, branca, elevada e de crescimento lento, cujo exame microscópico revelará apenas micélio septado e alguns clamidósporos. A 37°C, a cultura está em fase Y (yeast=levedura) e observa-se o desenvolvimento da colônia leveduriforme. Ao exame microscópico, observam-se células isoladas com gemulação simples e múltipla.

De grande valor no diagnóstico e prognóstico dessa micose são as reações imunológicas, como por exemplo, a reação de fixação do complemento, de precipitação e intradermoreação.

2) Histoplasmose:

É uma doença fúngica granulomatosa, cujo agente etiológico é o *Histoplasma capsulatum*. Este fungo apresenta especial afinidade pelo sistema reticuloendotelial (SER), produzindo diversas manifestações clínicas, sendo a forma pulmonar a mais freqüente.

H. capsulatum cresce em solos com alto teor de nitrogênio, geralmente associado com excretas de aves e morcegos. Solos de galinheiros, viveiros de aves, cavernas de morcegos são altamente propícios. As aves fornecem o substrato ideal para o crescimento do fungo no solo, podendo transportá-lo para outros locais em suas penas. Os morcegos são infectados, excretando o fungo em suas fezes, podendo disseminar a doença em suas migrações. O principal agente vetor é o vento, que pode disseminar os conídios a longas distâncias.

A inalação de uma quantidade suficiente de partículas infectantes do fungo gera a infecção primária no pulmão. Se a exposição for leve, a infecção será provavelmente assintomática, e se for maciça, o resultado será infecção sintomática aguda.

Diagnóstico laboratorial:

▪ Exame direto: O exame a fresco não representa muito valor no diagnóstico dessa micose, pela dificuldade de visualização das leveduras no interior das células do SER. Em material de biópsia corado pelo método da hematoxilina-eosina (HE) ou pelo Giemsa, observam-se células leveduriformes pequenas, redondas, intra-citoplasmáticas e que apresentam halo claro ao redor, imitando cápsula.

▪ Cultura: o cultivo deve ser feito em ágar Sabouraud dextrose a 25°C e em ágar BHI com sangue ou em meio Fava Netto a 37°C. A 25°C, a cultura está em fase M (mould-bolor) e observa-se o desenvolvimento de colônia esbranquiçada, cotonosa, que revela ao exame microscópico, micélio septado com conídios ornamentados denominados estalagmósporos. A 37°C a cultura está na fase Y (yeast=levedura), observa-se colônia cremosa e microscopicamente, apenas células leveduriformes ovaladas e pequenas.

▪ Testes sorológicos: provas sorológicas como reação de fixação do complemento, imunodifusão e imunofluorescência podem ser úteis no diagnóstico dessa doença.

3) Esporotricose:

O *Sporotrix schenckii* é um fungo dimórfico e agente da esporotricose, micose subcutânea gomosa, cuja principal forma clínica é a linfangite nodular ascendente dos membros.

O exame direto a fresco não apresenta muito valor no diagnóstico desta micose, pois as estruturas fúngicas não revelam características diferenciais em vida parasitária. Em material de biópsia observam-se leveduras em forma de “naveta”.

O cultivo deve ser realizado a 25°C e a 37°C. A 25°C a cultura encontra-se em fase M e observa-se o desenvolvimento de colônia cotonosa, a princípio branca, tornando-se, com o tempo, enegrecida e úmida. Ao exame microscópico observam-se hifas delgadas, septadas e conídios piriformes dispostos em forma de “margarida”, na extremidade e pedúnculos (conidióforos) ou inseridos diretamente nas hifas. Culturas envelhecidas revelarão conídios arredondados e dispostos paralelamente às hifas. A 37°C, a cultura está em fase Y e observa-se o desenvolvimento de uma colônia branca e cremosa. Ao exame microscópico observam-se leveduras elípticas ou em forma de naveta.

Diagnóstico laboratorial:

▪ Exame direto: a fresco não revela nenhuma forma conclusiva de *S. schenckii*. Esfregaços de pus corados pelo Gram, PAS ou Gomori, raramente permitem visualização do fungo. Pela técnica de imunofluorescência direta, a visualização do agente em pequeno número é mais fácil. As células fúngicas observadas nas lesões são raras e quando presentes, são vistas como leveduras com ou sem brotamento (formas de naveta), Gram +, PAS +, tamanho de 2-3µ x 3µ, sob forma de corpo asteróide, células esféricas de parede espessa. Cortes histopatológicos corados pelo Gram, PAS ou Gomori & Grocott mostram o fungo sob a forma de naveta ou charuto ou ainda formas asteróides, resultantes de uma relação hospedeiro-parasita.

▪ Cultura: excelente crescimento em ágar Sabouraud dextrose ou Mycosel. Cultura cresce em 3 a 5 dias, é um processo seguro e de rápido diagnóstico. O exame cultural pode ser complementado pelo poder patogênico experimental do fungo isolado, através de inoculação testicular em ratos, hamster ou camundongos, que desenvolverão orquite com pus rico em elementos fúngicos.

Características macroscópicas da cultura: em meio de ágar Sabouraud dextrose, à temperatura ambiente, as colônias de *S. schenckii* são de formas e cores variadas, de esbranquiçadas a negras, superfície plissada, levemente aveludada e de consistência elástica. À temperatura de 37°C a cultura é leveduriforme, de consistência cremosa e de cor amarelo creme.

Características microscópicas da cultura: a forma miceliana é obtida em microcultivo em lâmina, verifica-se a presença de finos filamentos septados, com conídios redondos ou piriformes, dispostos ao longo das hifas ou na forma característica em “margarida”. À 37°C apresenta-se sob a forma de levedura com brotamento.

QUESTÕES PARA ESTUDO

- 1- Quais as formas de contágio das micoses causadas por fungos com dimorfismo térmico?**
- 2- Quais as características microscópicas e macroscópicas marcantes dos fungos que apresentam dimorfismo térmico?**