

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Aula T/P5: CONTROLE DAS POPULAÇÕES MICROBIANAS – ANTIBIOGRAMA E ANTIMICROBIANOS NATURAIS

Profa. Elisabete Vicente (bevicent@usp.br)

Resumo:

DIA 1: - Apresentação da Prática e do Questionário para Estudos.

DIA 2: Leitura de Análise dos Resultados, Discussão e Conferência de algumas Respostas do Questionário.

DIA 3: Relatório Final e de todas Questões Respondidas.



Olá!

Recado:

- As Tarefas propostas (Dia 1) estão em fonte preta,

- As Análises, Discussões e Respostas das Questões (Dia2) estão em fonte colorida.

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 contaminações microbianas.**

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 (considere as diferenças entre calor seco e calor úmido), as baixas temperaturas e as radiações. Quanto aos **agentes químicos**, inúmeros são empregados, tais como: formol, fenol, óxido de etileno, entre outros. Ainda podemos acrescentar a **filtração** de soluções, que embora não iniba ou mate os microrganismos, permite a remoção destes com consequente esterilização.

No controle das populações microbianas, os **antibióticos** são muito importantes e, por isto, serão estudados com atenção especial em Aula T (Antibióticos e Resistência bacteriana) e em aula T/P (Antibiograma).

A diferença fundamental entre **Antibióticos** e “**Agentes antimicrobianos químicos**” (Desinfetantes e Antissépticos) reside no fato de que os antibióticos podem ser introduzidos no organismo, desde que, em doses prescritas que não causem danos à célula animal, pois têm toxicidade seletiva (veremos com mais detalhes isto na Aula T. Os agentes químicos, de modo geral, são agressivos às células e só podem ser utilizados na desinfecção de instrumentos e de superfícies (Desinfetantes) ou na antisepsia da pele e mucosas (Antissépticos), como veremos na Aula T – Esterilização e Desinfecção).

OBJETIVO

Nesta Aula T/P, serão estudados “**Antibiograma e antimicrobianos naturais**”.



PRÁTICA A: ANTIBIOGRAMA - DIA 1:

A) Introdução:

O antibiograma é um teste que permite a verificação *in vitro* da sensibilidade de uma bactéria a vários 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.

O tamanho do **diâmetro do halo de sensibilidade** é **medido em mm** e é analisado frente aos valores de um padrão em uma Tabela fornecida pelo fabricante dos antibióticos em análise (**Tabela 1**). Este procedimento permite se saber se a bactéria é: **Sensível**, apresenta **Sensibilidade Intermediária**, ou é **resistente** ao antibiótico presente no disco.

O antibiograma é uma técnica fundamental, pois permite a escolha do antimicrobiano apropriado para o controle de infecções bacterianas. Assim, tem como objetivo determinar a sensibilidade aos antibióticos da bactéria em análise causadora da infecção.

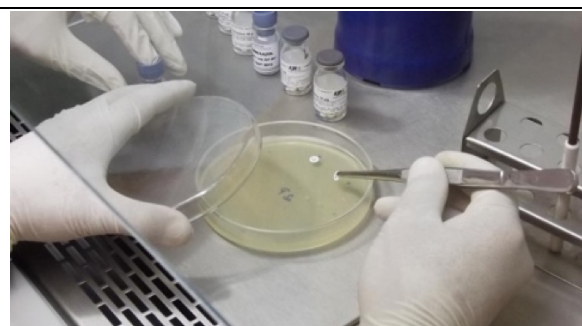
B) Material:

- 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 - Zangarinas (2 unidades), Pinça (1 unidade), régua (1 unidade)

C) Procedimento:

1. Utilizando uma zangarina 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 (**Fig. 1**);



5. Incubar em estufa, a 37 °C, durante 16-24 horas.

D) Resultados:

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 no **Quadro 1**.

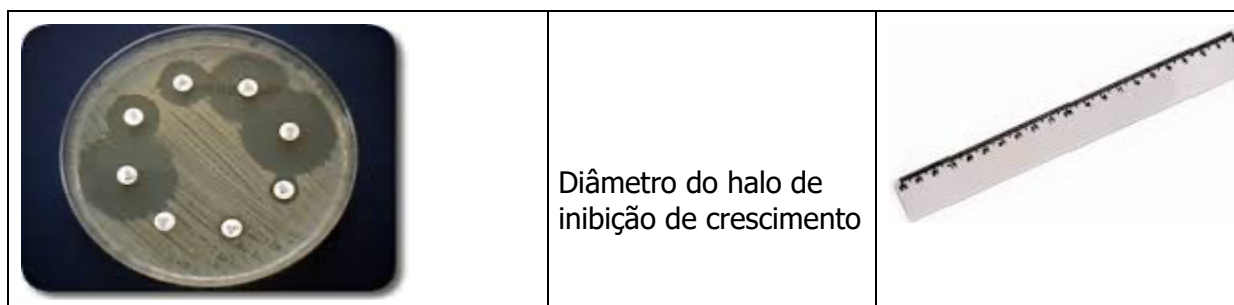


Fig. 4: Medição de halos de inibição de crescimento de colônias bacterianas

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*.

E) Análise e Interpretação:

1. Utilizando a Tabela padrão (**Tabela 1**), analise a sensibilidade das bactérias aos diversos antibióticos pesquisados. Registre suas análises no **Quadro 1** abaixo:

Quadro 1: Resultados do antibiograma dos isolados E. coli e S. aureus analisados.

Antibiótico	Sigla	Conc	R	I	S	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	Resultado

QUESTOES PARA ESTUDO e FIXAÇÃO

1. O que é e qual a utilidade de um Antibiograma?
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. Devem ser utilizados discos de antibióticos diferentes para pesquisa de sensibilidade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas? Por quê?
5. Qual a diferença de um antibiótico **bacteriostático** e um **bactericida**?
6. O que é **CIM** (ou **MIC**)?

PRÁTICA B- Complementar: ANTIMICROBIANOS NATURAIS- DIA 1:

A) Introdução:

Muitos vegetais contêm compostos que são inibidores de crescimento de microrganismos e, na natureza, exercem papel importante na resistência destes vegetais a vários patógenos. São exemplos desta resistência natural o alho, o cravo, e vários temperos. Com o passar os tempos o homem aprendeu a utilizá-los visando o aumento do tempo de prateleira de alimentos.

A ação antimicrobiana destes aditivos alimentares pode ser verificada analisando-se de **extratos** ou **partes homogeneizadas** de vegetais colocados frente a culturas de microrganismos. A seguir, vamos fazer a análise da presença de compostos antimicrobianos em alguns temperos vegetais.

B) Material:

- 1 - Tubo com cultura líquida de *Staphylococcus aureus*;
- 2 - Tubo com cultura líquida de *Escherichia coli*;
- 3 - Placas com meio completo sólido TSA.
- 4.-Podem ser utilizados: Alho, cebola, coentro, orégano, tomilho, hortelã, cravo, etc.
- 5 - Zaragatoas ou Cotonetes. (2 unidades), Pinça (1 unidade), régua (1 unidade)
6. Graal e pistilo.
7. Discos de papel de filtro.

C) Procedimento:

1. Mergulhar o cotonete na suspensão do microrganismo;
2. Espalhar sobre a superfície do meio solido com o cotonete que foi embebido na cultura;
3. Macerar o agente antimicrobiano a ser testado, 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 37 °C, em estufa, por 16-24 horas e observar os halos de inibição.

D) Resultados:

1. Desenhe no **Figura 5** abaixo os Resultados obtidos com os antimicrobianos naturais utilizados

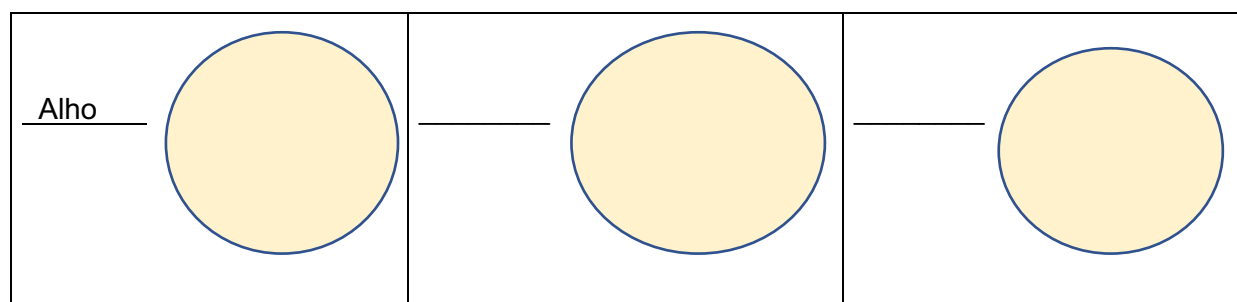


Figura 5: Efeito antimicrobiano de temperos e de aditivos alimentares caseiros.

E) Análise, Discussão e Conclusões:

QUESTOES PARA ESTUDO e FIXAÇÃO

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