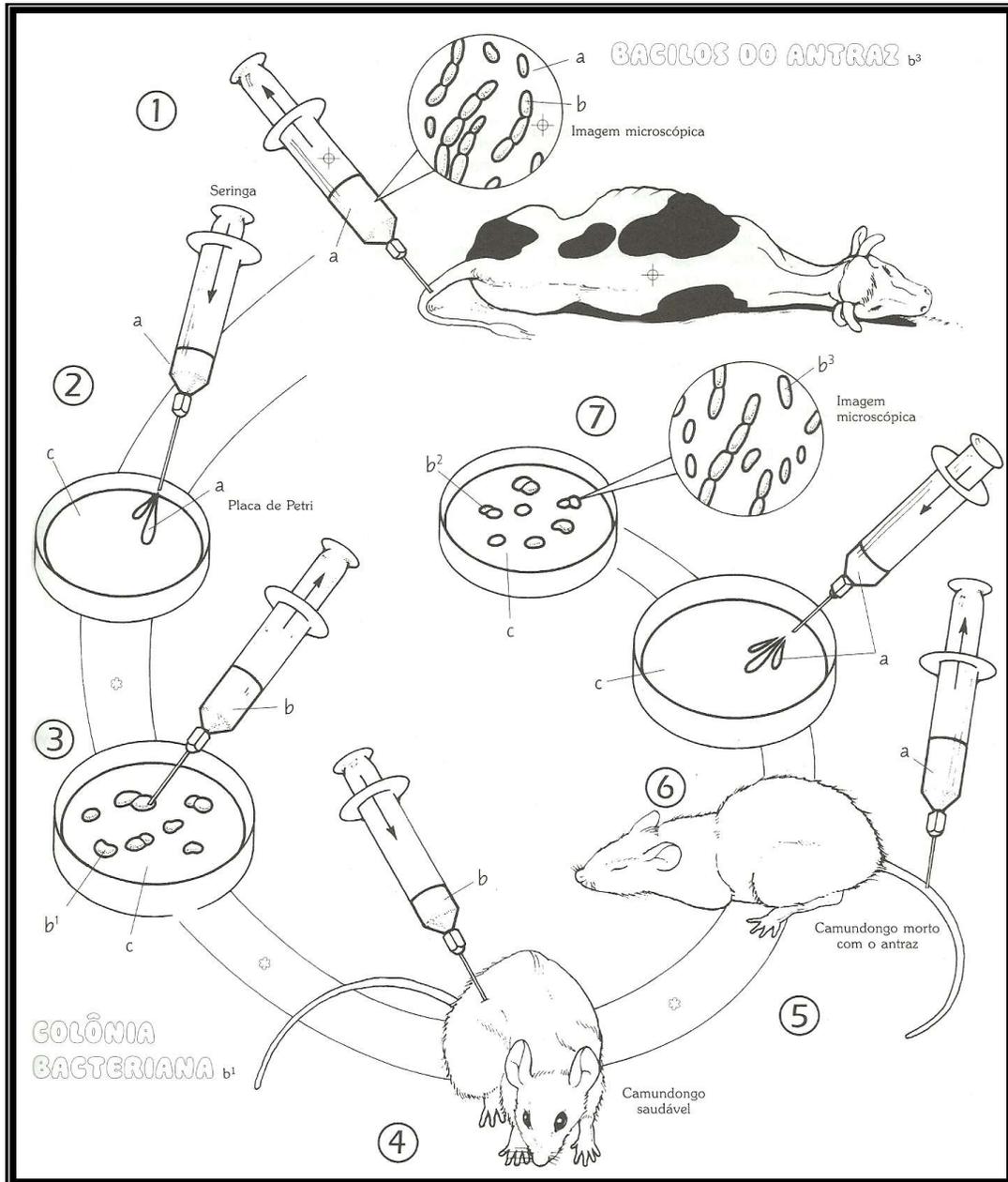




**DISCIPLINA MICROBIOLOGIA BÁSICA E APLICADA  
BMM-0413**



### Recomendações Retorno Seguro - COVID-19

- 1) Em todas as salas e laboratórios de aulas do ICB teremos: i) *dispenser* automático de álcool em gel; ii) placas com a informação da obrigatoriedade da vacinação completa (uma dose da vacina Janssen ou duas doses de quaisquer outras vacinas contra o SARS-CoV-2); iii) uso contínuo e adequado de máscaras (cirúrgica ou PFF2); iv) não comer ou beber em sala de aula (Artigo 250 do Regimento Geral da Universidade de São Paulo); v) cartazes fixos nos auditórios, anfiteatros e laboratórios de aulas práticas alertando os alunos.
- 2) Nas listas de presença serão identificado(a)s com o sinal “@” os estudantes que comprovaram o esquema vacinal completo, estando autorizados a freqüentar as atividades presenciais nos campi da USP. Estudantes não autorizados que compareçam às aulas, devem estar cientes que não lhes será computada a frequência, nem tampouco atribuída à nota.
- 3) Quando possível, manter distanciamento de 1 metro em postos fixos de trabalho, salas de aula ou laboratórios.
- 4) As janelas e portas deverão ficar abertas, mesmo com o ar-condicionado ligado.
- 5) Solicitamos a todos que não se aglomerem em espaços comuns, além da contaminação, para evitar ruído.
- 6) Consultar Boletins informativos periódicos do retorno seguro.
- 7) Buscar realizar recreio escalonado (caso possível)
- 8) A espera dos intervalos devem ser espaços abertos.
- 9) O afastamento simplificado das atividades de ensino será o mesmo facultado a todos os membros da comunidade, mediante autodeclaração de sintomas compatíveis com Covid-19, que deverá ser inserida nos sistemas corporativos computacionais (no caso dos alunos de graduação no sistema JupiterWeb), segundo o protocolo disponível no site Retorno Seguro. No caso da autodeclaração, o estudante se afasta por 7 dias, persistindo os sintomas mais 3 dias, a partir desse ponto precisa de atestado médico. Durante essa fase, o estudante é afastado da sala de aula e tem as faltas abonadas.
- 10) A autodeclaração só poderá ser utilizada pelo estudante uma única vez; caso ele se contamine uma segunda vez é necessário atestado médico segundo as normas da USP.
- 11) Caso algum aluno se contamine, as aulas para aquela turma continuam presencial; pois como todos estarão vacinados e de máscaras, a probabilidade de contaminação em sala de aula é muito baixa.
- 12) Caso algum professor se contamine, a princípio outro colega assume as aulas, mas se não houver tal competência, as aulas serão repostas no final do semestre.
- 13) **Higienizar as mãos e microscópio antes e depois do uso entre diferentes usuários. Privilegiando uso individualizado.**
- 14) Para maiores informações acesse o portal retorno seguro: <https://retornoseguro.usp.br/>

## INTRODUÇÃO À BIOSSEGURANÇA

### I - NORMAS GERAIS DE SEGURANÇA PARA O TRABALHO NO LABORATÓRIO

1. Utilizar avental limpo.
2. Manter as unhas curtas e os cabelos curtos ou presos.
3. Ingressar no laboratório com calçado fechado.
4. Portar somente material para anotações (caderno, caneta, lápis, marcador de tubos/vidros).
5. Não fumar no interior do laboratório.
6. Não comer, beber, mascar chicletes e não levar as mãos à boca.
7. Trabalhar de maneira sistemática e organizada, sempre com muita atenção.
8. Identificar adequadamente todo o trabalho realizado (placas de petri identificadas com nome e data na parte posterior - não na tampa).
9. Trabalhar com rigorosa assepsia.
10. Descartar o material utilizado nos recipientes apropriados e identificados.
11. Não retirar nenhum material ou culturas do ambiente de trabalho.
12. Ao término dos trabalhos, ordenar e desinfetar o local, bem como, não esquecer de desligar o gás e apagar as luzes.
13. Antes de sair do laboratório, lavar sempre as mãos e, caso seja possível, lavar as unhas com escovinha e sabão desinfetante.
14. Comunicar todo e qualquer acidente ao responsável pelo laboratório.
15. Depois de usar o microscópio, desligar a luz e limpar a objetiva com lenço de papel.
16. Para facilitar a compreensão e o bom andamento das atividades é indispensável um estudo prévio das normas correspondentes ao trabalho prático a ser efetuado no laboratório.

## II - TRABALHO NO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA:

### CONCEITOS GERAIS:

O primeiro dever de uma pessoa que trabalha em um laboratório de Microbiologia é adquirir a consciência do “invisível” e recordar que, constantemente, em todas as partes, existem numerosos organismos, a menos que se tenha tomado medidas para eliminá-los.

Existem microrganismos inócuos e microrganismos patogênicos. Para que esses microrganismos não contaminem o material de trabalho e não venham a constituir risco para as pessoas saudáveis ou enfermas, foram desenvolvidas diversas técnicas para sua destruição (físicas, químicas ou biológicas), sendo indispensável adotar certas normas a cada vez em que se trabalhe no laboratório.

### A – AMBIENTE DE TRABALHO:

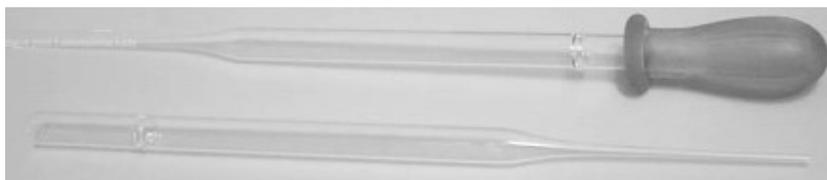
- a) Iluminação: o local deve ser bem iluminado, sem projeção de sombras, e essa luz pode ser natural ou artificial. No caso de se adotar uma iluminação artificial, esta não deve modificar a coloração dos meios de cultura, das colônias etc.
- b) Bancada: deve ser constituída de material liso, impermeável, não combustível e resistente a substâncias ácidas e básicas.
- c) Assentos: o ideal é que a pessoa trabalhe sentada, devendo o assento ser cômodo e ter a altura suficiente para apoiar os cotovelos sobre a bancada, tornando desta forma o trabalho mais seguro.

### B – MATERIAIS BÁSICOS:

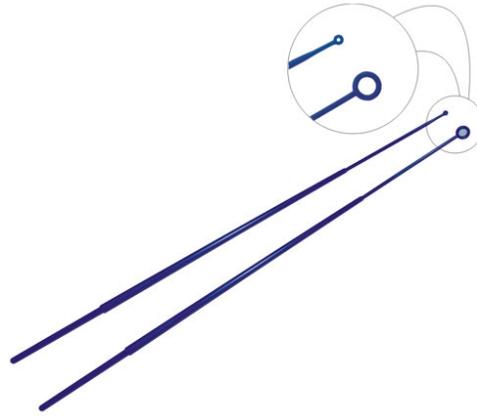
a) Placa de Petri: é uma placa circular de vidro (ou plástico descartável) que é composta de uma base e de uma tampa de superfícies planas. Nesta placa são adicionados os meios de cultura sólidos onde ocorrerá o desenvolvimento dos microrganismos.



b) Pipetas Pasteur: são preparadas a partir de um tubo de vidro em diferentes diâmetros (2 até 8 mm). Num dos extremos deve haver algodão hidrófobo, sendo o outro extremo estirado e fechado na chama. Também são comercializadas pipetas Pasteur de material plástico, descartáveis.



c) Alça de platina: possui um cabo onde se acopla um fio de platina ou níquel-cromo. Quando o fio de platina termina no formato de um anel, recebe o nome de “alça”. Se for achatado é chamado de “espátula” e no caso de ser reto, denomina-se “agulha”.



Além do material especificado anteriormente, no trabalho bacteriológico se empregam outros materiais de uso corrente em laboratórios.

## MICROSCOPIA

Os avanços na área de Microbiologia estão diretamente relacionados ao desenvolvimento da microscopia. Ainda que existam diferentes tipos de microscópios, o mais utilizado é o de campo claro. Este utiliza a luz branca como fonte de iluminação, cujo feixe passa diretamente através do objeto que se deseja observar.

O microscópio é constituído por uma parte mecânica e outra óptica.

### PARTE MECÂNICA:

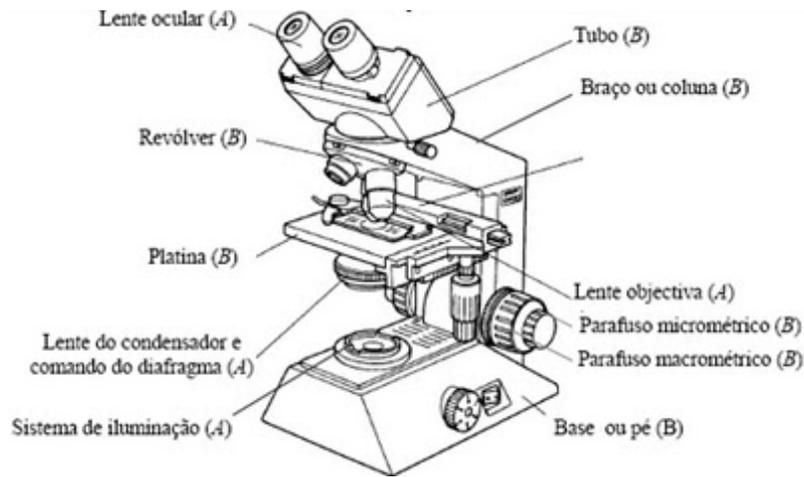
Base: sustenta o microscópio e permite manter a sua estabilidade.

Coluna ou braço: corresponde à parte do microscópio na qual se encontram as lentes oculares e objetivas, além do condensador e do sistema de foco com os parafusos macro e micrométricos.

Mesa ou Platina: é uma peça horizontal, com um orifício em sua parte central, que permite a passagem dos raios luminosos, onde se fixa a preparação a observar. Esta peça possui um “carro” que permite deslocar a preparação para melhor observação. Abaixo da platina, encontra-se o condensador.

Tubo ou canhão: é um cilindro metálico com interior escuro para evitar a reflexão de luz. O tubo suporta a lente ocular na extremidade superior e, na porção inferior, possui uma peça denominada “revólver”, que é uma peça giratória portadora de objetivas de diferentes ampliações, podendo ser objetivas de 10x, 40x, 100x e, em alguns, 4x.

Sistema de foco: composto pelos parafusos macro e micrométricos, que permitem distanciar ou aproximar o canhão à platina, com o objetivo de procurar o ponto de foco. O parafuso macrométrico permite um movimento rápido e o micrométrico permite um ajuste suave e preciso.



### PARTE ÓPTICA:

Fonte luminosa: nos microscópios utilizados atualmente, a fonte luminosa já está incluída como parte do mecanismo. O objetivo da fonte luminosa é produzir um cone de luz homogêneo e amplo.

A maioria dos microscópios utiliza luz gerada por filamentos de tungstênio que produzem uma luz de comprimento de ondas do espectro visível. Além disso, utilizando um filtro azul, é produzida uma luz de comprimento de onda menor, que permite aumentar o poder de resolução do microscópio.

Em óptica, **poder de resolução** refere-se à capacidade que as lentes têm de discriminar entre objetos próximos. Quanto maior o poder de resolução, maior será a capacidade do microscópio em mostrar detalhes do objeto observado.

O poder de resolução depende do comprimento de onda da luz e da abertura numérica. O comprimento de onda da luz visível é fixada dentro de certos limites, e para aumentar o poder de resolução, precisa-se modificar a abertura numérica. A abertura numérica é a medida do ângulo do máximo do cone de luz que entra nas lentes da objetiva e corresponde ao número que aparece nas lentes objetivas após o aumento (4/0.1 -10/0.25 40/0.65 -100/1.25). O máximo poder de resolução do microscópio óptico utilizando a objetiva de imersão é ao redor de 0,2µm. A seguinte fórmula é utilizada:

$$R = \frac{L}{2 A N}$$

R = poder de resolução.

A N = abertura numérica (cada objetiva traz gravado esse valor).

L = comprimento de onda.

Exemplo: o poder de resolução do microscópio, utilizando uma objetiva de imersão será (A N = 1,25)

$$R = L / 2 A N$$

$$R = 0,5 / 2 \cdot 1,25 = 0,2 \mu\text{m}$$

Ou seja, esta objetiva possui a capacidade de formar imagens independentes que se encontram separadas entre si, na preparação, por uma distância de 0,2  $\mu\text{m}$ .

Diafragma: permite regular o feixe luminoso, aumentando ou diminuindo o mesmo.

Condensador: corresponde a um sistema de lentes que está colocado abaixo do orifício central da platina e cuja função é condensar os raios luminosos na preparação. Modificações no condensador permitem transformar o microscópio de campo claro em microscópio de campo escuro ou no de contraste de fase.

Ocular: é constituída por duas lentes; a superior ou ocular propriamente dita, de tamanho menor, e a inferior, de tamanho maior, chamada de lente de campo. Sempre levam anotado o aumento que produzem (8x, 10x, 12,5x).

Objetivas: estas lentes, no geral, correspondem aos aumentos 10 e 40 de microscopia seca, ou seja, existe ar entre a preparação e a lente; e 100 de microscopia de imersão, na qual se utiliza óleo de imersão, entre a preparação e a objetiva. A amplificação total do microscópio é obtida multiplicando-se a amplificação da ocular pela amplificação da objetiva que se está utilizando.

Em Microbiologia, a objetiva mais utilizada é a de imersão, cujo aumento é de 100 vezes, de modo que, se a ocular tem um aumento 10x, estaremos amplificando 1000 vezes o diâmetro do observado. Neste tipo de microscopia, coloca-se uma gota de óleo de imersão sobre a lâmina onde está a preparação, de modo que a objetiva fique em contato com esse óleo. O objetivo disso é fazer o feixe de luz, depois que atravessa a preparação, passar através do óleo e não do ar, como ocorre no caso das objetivas secas de 10 e 40, evitando assim a refração dos raios luminosos.

### **CUIDADOS COM O MICROSCÓPIO:**

**A extraordinária precisão, tanto do sistema óptico como do sistema mecânico do microscópio, exige uma série de cuidados que se deve ter após cada observação.**

**A poeira é a maior inimiga do microscópio e ao acumular-se no sistema de foco, faz com que o instrumento perca sua precisão. Nas peças ópticas, a poeira prejudica a qualidade da imagem.**

**O óleo de imersão, as impressões digitais e outras impurezas acumuladas na lente frontal da objetiva prejudicam a nitidez da imagem, que aparece borrada e com pouco contraste.**

**Pelas razões anteriormente descritas, cuidados como: evitar o acúmulo de poeira, óleo de imersão, entre outros, são fundamentais. Para eliminar a poeira e o óleo do sistema óptico, este deve ser limpo utilizando-se um pano seco que não desprenda pêlos ou ainda um pano umedecido em solvente (xilol, álcool, éter, etc.).**

**A parte mecânica deve ser limpa utilizando-se um pano que não desprenda restos.**

**Uma vez terminada a jornada de trabalho e após o procedimento de limpeza do microscópio, este deve ser guardado coberto com plástico apropriado, sendo assim protegido de sujidades.**

# Módulo I: Bacteriologia

## AULA PRÁTICA Nº 1

### **COLORAÇÃO DE GRAM: OBSERVAÇÃO DE BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS E GRAM-NEGATIVAS. OBSERVAÇÃO MICROSCÓPICA DOS MICRORGANISMOS**

A observação microscópica tem por objetivo determinar a morfologia e o agrupamento dos microrganismos, as suas características de tintura, além de outras características tais como: movimento, tipo de flagelo, presença de cápsula, esporo etc.

O exame microscópico pode ser realizado a partir de uma amostra (exame direto) ou a partir de cultivo. De acordo com a sua preparação, classificam-se em:

**I – EXAME A FRESCO:** microrganismos vivos.

- a) Sem coloração;
- b) Com coloração vital.

**II – ESFREGAÇO FIXADO:** microrganismos mortos.

- a) Com coloração simples;
- b) Com coloração composta.

### **EXAME MICROSCÓPICO A FRESCO:**

O exame microscópico a fresco é utilizado, principalmente, para a observação de motilidade em bactérias. No caso de microrganismos de maior tamanho, como fungos e protozoários, esta técnica permite determinar, além disso, as características morfológicas.

No exame microscópico a fresco, realiza-se uma preparação úmida entre lâmina e lamínula. Exemplificando, se o material a ser examinado é sólido, como colônias de bactérias, suspender em gotas de soro fisiológico. Entretanto, no caso do material ser úmida como amostra de caldo de cultivo, deposita-se diretamente, com pipeta Pasteur, sobre a lâmina. Deve-se tomar cuidado para que não ocorra formação de bolhas entre a lâmina e a lamínula. Se o exame a fresco for realizado com coloração vital, deve ser agregada à suspensão inicial uma pequena quantidade de algum corante vital como o azul de metileno, pois este permitirá aumentar o contraste dos microrganismos, facilitando assim sua observação.

Também existe um tipo de exame a fresco que se realiza em “gota pendente” utilizando uma lâmina escavada.

Quando se deseja determinar, através desse tipo de observação, se uma bactéria é móvel, há que se ter em mente que as bactérias, por possuírem cargas negativas em sua superfície externa, estão em constante repulsão. Isto determina um movimento de tipo vibratório, conhecido como movimento browniano. Também podemos observar os movimentos de correntes de líquidos, principalmente, em preparações recentes, nas quais todo o observado se move em um mesmo sentido. As bactérias móveis apresentam, em um mesmo campo microscópico, movimentos em zig-zag, com mudanças de direção ou girando sobre si mesmas, o que permite diferenciá-los dos tipos de movimentos citados anteriormente.

## EXAME MICROSCÓPICO DE ESFREGAÇO FIXADO E CORADO:

Este método permite observar com maior precisão detalhes morfológicos e de agrupamento dos microrganismos.

Para o preparo do esfregaço, realiza-se uma suspensão do microrganismo em água, se o mesmo for proveniente de um meio sólido, mas em se tratando de um líquido, deposita-se uma pequena quantidade sobre uma lâmina, com o auxílio de uma alça de cultivo ou de uma pipeta Pasteur. A suspensão deve ser levemente opaca, já que um esfregaço muito denso não permitiria individualizar os microrganismos, o que dificultaria sua observação.

A fixação é realizada colocando-se a lâmina com a preparação, ~15 cm acima da chama de um bico de Bunsen, para que ocorra a desidratação e a conseqüente aderência dos microrganismos à lâmina. Uma alternativa seria deixar a lâmina secar à temperatura ambiente e, em seguida, fixá-la, cobrindo-a com metanol, álcool-éter ou outro composto. Uma vez realizada esta etapa, o esfregaço está pronto para ser corado.

A coloração simples consiste na aplicação de um corante apenas, enquanto que as colorações compostas são realizadas utilizando-se pelo menos dois corantes, um fixador e um descorante, permitindo determinar diferentes comportamentos da bactéria frente à coloração.

Corantes: geralmente, os são sais de anilina. Os corantes básicos consistem em um cátion colorido unido a um ânion incolor. Os corantes ácidos consistem em um ânion colorido unido a um cátion incolor.

Os corantes mais utilizados em microbiologia são básicos, devido às características das células bacterianas, que são ricas em ácidos nucleicos com cargas negativas. Os cátions coloridos do corante se combinam com os ácidos, corando a célula. Os corantes ácidos não coram a bactéria, apenas coram o meio que a rodeia.

Fixador: é toda substância que forma compostos insolúveis com os corantes, o que permite a fixação destes à célula (lugol-fenol).

Descorantes: são substâncias químicas que permitem o descoramento de algumas bactérias e o de outras não, evidenciando assim, certas características de sua estrutura (gram-positivo, gram-negativo, álcool-ácido resistente, etc.). Como exemplo de descorantes, temos a álcool-éter, álcool-clorídrico...

## COLORAÇÕES COMPOSTAS UTILIZADAS EM MICROBIOLOGIA:

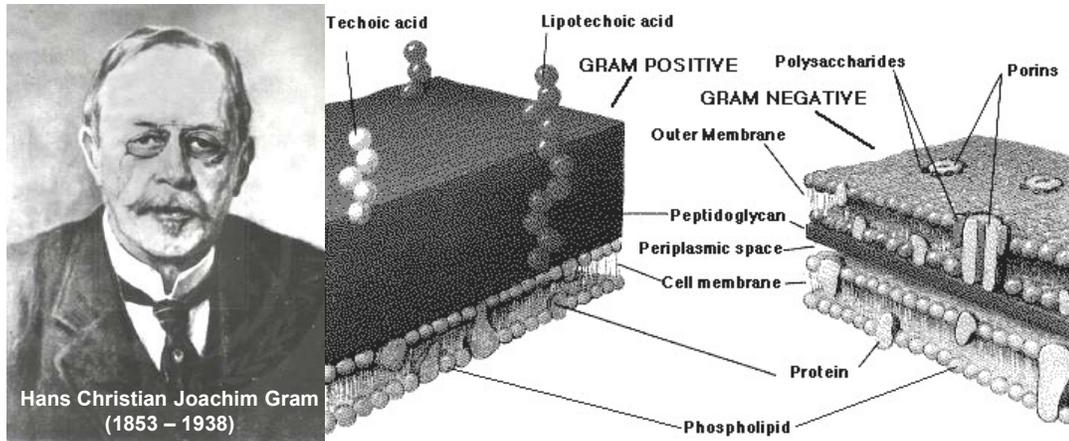
**COLORAÇÃO DE GRAM:** esta coloração permite diferenciar as bactérias em Gram positivas e Gram negativas, segundo as características da parede celular.

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 **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**.

Quando aplicado em células **gram-positivas e gram-negativas**, o corante **crystal violeta** (violeta de genciana) e o iodo (**lugol**) penetram facilmente, porém, dentro das células, eles se combinam para formar o complexo cristal violeta-lugol.

Nas bactérias **gram-positivas**, por causa da maior quantidade de peptidoglicano, o complexo iodo-cristal violeta 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**.



### **Atividade Prática:**

Cada aluno realizará uma coloração de GRAM a partir de esfregaços fixados. Adicionalmente, cada grupo poderá coletar amostras de diferentes ambientes e sítios corpóreos com “swab estéril”, fazendo um esfregaço em lamina de vidro, fixando e corando.

**Técnica:** fazer um esfregaço com as bactérias crescidas em caldo ou placa de ágar, ou com a amostra coletada com “swab estéril”.

- Cobrir o esfregaço com violeta de genciana ou cristal violeta por 1 minuto;
- Lavar;
- Cobrir com lugol (fixador) por 1 minuto;
- Lavar;
- Descorar com álcool-éter e lavar imediatamente;
- Cobrir a lâmina com safranina (ou fucsina) por 10 segundos;
- Lavar novamente em água corrente;
- Secar a lâmina, pressionando-a levemente entre duas folhas de papel de filtro, com o cuidado para não remover o esfregaço corado;
- Observar ao microscópio, com objetiva de imersão (objetiva 100X);

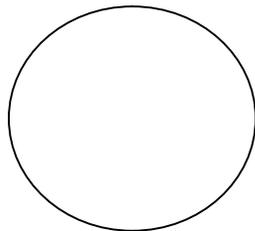
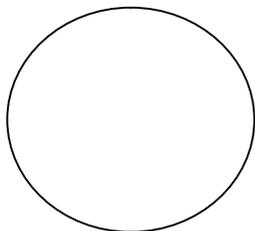
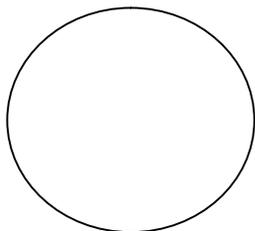
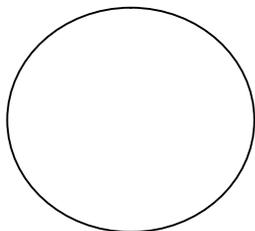
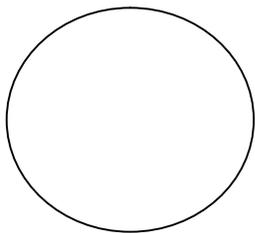
Obs.: após a coloração, cuidado para não inverter a face da lâmina com as bactérias;

- O condensador do microscópio deve estar elevado;
- A focalização deve ser realizada com cuidado e paciência, iniciando-se com aumento 10X.

Esta coloração é fundamentada no fato de que a mistura álcool-éter dissolve os lipídios da membrana externa das bactérias Gram negativas, que se descoram, corando-se posteriormente com a safranina (ou fucsina).

**Interpretação:** as bactérias gram-positivas retêm o cristal violeta, corando-se de violeta escuro. As bactérias Gram negativas apresentam-se com coloração rosada.

**OBSERVAÇÃO E ANOTAÇÃO DOS RESULTADOS (DESENHAR):**

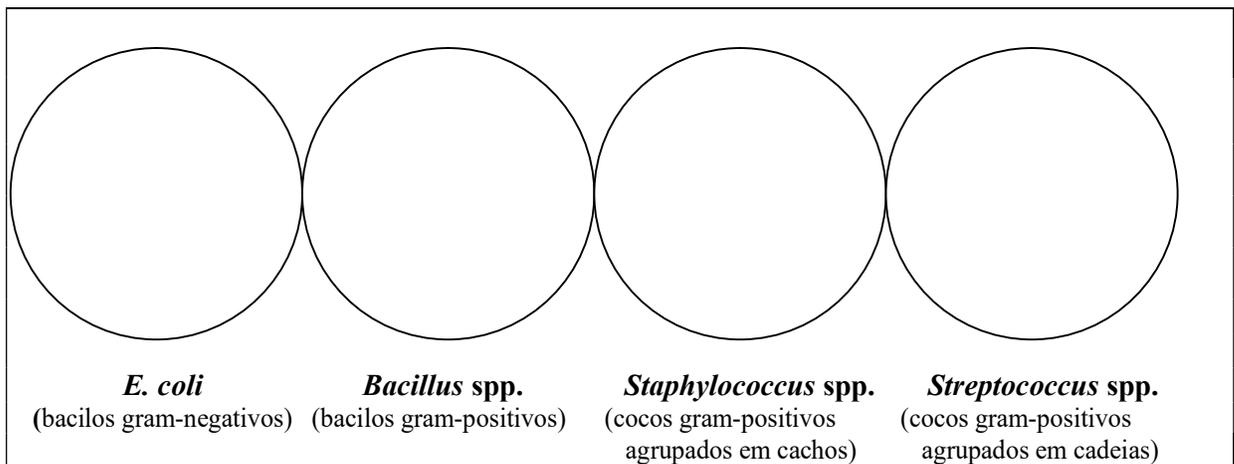


<b>Bactéria (espécie)</b>	<b>Descrição microscópica</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Streptococcus spp.</i>	
<i>Escherichia coli</i>	
<i>Bacillus spp.</i>	
Amostra coleta com “swab estéril”	

## QUESTÕES PARA ESTUDO

1. Descreva a estrutura e composição das paredes das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas

2. Desenhe morfologia e agrupação para as seguintes espécies:



3. Comente a importância da coloração do Gram para um profissional veterinário.

## AULA PRÁTICA Nº 2

### **CULTURA PURA E ISOLAMENTO BACTERIANO EM MEIOS LÍQUIDOS E SÓLIDOS**

#### NUTRIÇÃO E CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS

Os microrganismos, como outra qualquer célula, necessitam de substâncias ou nutrientes para viver e se multiplicar. Quando os requerimentos nutritivos são proporcionados por um organismo vivo, este é denominado HOSPEDEIRO. Se os nutrientes são obtidos por um meio artificial, denomina-se MEIO DE CULTURA.

Os requerimentos nutricionais variam de um organismo para o outro e são determinados, em parte, por sua constituição genética e também por fatores ambientais.

Os principais elementos da célula são: H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, (85% na forma de H<sub>2</sub>O), C, N, S e P. Além disso, necessitam de oligoelementos como: Na, K, Ca, Mg, Fé, Zn, Cu, Co, etc.

Deve ser considerada também uma série de reações químicas (metabolismo), que permitirão à célula incorporar estes elementos, já que na natureza encontram-se como “compostos”. Estas trocas químicas podem ser de dois tipos:

- **Catabolismo:** degradação ou decomposição de um substrato com a finalidade de se obter material para a célula e para a obtenção de energia.
- **Anabolismo:** elaboração ou síntese de compostos.

#### **CULTIVO DOS MICRORGANISMOS**

Para poder estudar os microrganismos é necessário que estes existam em quantidade suficiente, quantidade esta que, geralmente, não é encontrada em seu habitat natural. Para que esse objetivo seja alcançado, utiliza-se o cultivo microbiológico.

Cultivar um microrganismo significa proporcionar-lhe, em um meio de cultura, todos os nutrientes dos quais ele necessita para poder multiplicar-se, além de condições ambientais adequadas.

Um meio de cultura adequado necessita de:

1. Fonte de energia (que é obtida por fermentação, respiração ou fotossíntese);
2. Fonte de carbono;
3. Fonte de nitrogênio;
4. Fonte de enxofre;
5. Fonte de fósforo;
6. Fonte de minerais (Mg, Fe, K, Mn, Mo, Co, Cu, Zn);
7. Fatores de crescimento: são compostos orgânicos dos quais a célula necessita, mas que não é capaz de sintetizar (aa, vitaminas, purinas, pirimidinas, etc.);
8. Fatores ambientais:

a) **pH:** a grande maioria das bactérias desenvolve-se em pH neutro, todavia, existem microrganismos acidófilos e outros que preferem um pH alcalino;

b) **Temperatura:** segundo a temperatura ótima de desenvolvimento, temos microrganismos:

- psicrófilos: 15 a 20°C;
- mesófilos: 30 a 37°C;
- termófilos: 50 a 60°C.

c) **Atmosfera:** segundo o requerimento de O<sub>2</sub>, os microrganismos classificam-se em:

- aeróbios estritos: requerem O<sub>2</sub> atmosférico;
- anaeróbios facultativos: requerem, ou não, O<sub>2</sub> atmosférico;
- anaeróbios obrigatórios: não requerem O<sub>2</sub> atmosférico;
- microaerófilos: requerem concentrações menores de O<sub>2</sub> (<21%);
- capnofílicas: requerem concentrações maiores de CO<sub>2</sub>.

A microaerofilia pode ser estrita (5% de O<sub>2</sub>), a qual é obtida com geradores de CO<sub>2</sub>, ou parcial (12 – 17% de O<sub>2</sub>), obtida em uma jarra de vela.

Atmosfera normal: 21% O<sub>2</sub>; < 0,5% CO<sub>2</sub>;

Atmosfera anaeróbica: 10% H<sub>2</sub>; 85% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>;

Atmosfera microaerófila estrita: 5% O<sub>2</sub>; 85% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>;

Atmosfera microaerófila parcial (vela) (MO capnofílicas): 12 – 17% O<sub>2</sub>; 5% CO<sub>2</sub>.

Existem diferentes técnicas para o cultivo de microrganismos anaeróbios obrigatórios, sendo a mais utilizada a jarra anaeróbica que utiliza substâncias químicas que, ao agregar-lhes água, liberam CO<sub>2</sub> e hidrogênio, este último, em presença de um catalizador (paládio), une-se ao O<sub>2</sub> contido na jarra e forma H<sub>2</sub>O. Outro sistema é baseado em ácido ascórbico e carvão ativado.

d) **Pressão osmótica e forças iônicas:** existem alguns organismos, como os marinhos, que estão adaptados a crescer em ambientes com altas concentrações de sal (halófitas).

e) **Tempo de incubação:** o tempo de incubação varia segundo a espécie que se deseja isolar. A grande maioria das espécies de interesse clínico humano necessita um período de incubação entre 18 a 48h. Todavia, há exceções como no caso de Leptospiras, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, etc.

f) **Esterilidade:** o cultivo dos microrganismos utiliza-se com os seguintes propósitos:

- isolar microrganismos a partir de diferentes produtos (água, leite, alimentos, produtos patológicos);
- multiplicação de uma determinada espécie;
- identificação de um microrganismo através da determinação dos produtos;

Para que os objetivos sejam alcançados é imprescindível que todo o material empregado esteja estéril, ou seja, livre de todo tipo de microrganismo.

## CLASSIFICAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura são preparados estéreis que contém todos os nutrientes e elementos necessários para o desenvolvimento microbiano.

**Classificam-se, segundo seu estado físico, em:**

- Líquidos;
- Semi-sólidos;
- Sólidos.

Para transformar um meio líquido em semi-sólido ou sólido, utiliza-se uma substância denominada ágar-ágar. Esta é um polissacarídeo ácido obtido de algas marinhas, possui a

propriedade de não ser tóxico e são poucas as bactérias capazes de destruí-lo. Funde-se a 100°C, permanecendo em estado líquido a temperaturas de 45 a 50°C. a 37°C e, à temperatura ambiente, mantém-se em estado sólido. É utilizado na proporção de 1,5 a 2%, quando a finalidade for a obtenção de um meio sólido.

**Classificam-se, segundo os nutrientes, em:**

- Meios sintéticos: meios compostos somente por substâncias químicas conhecidas;
- Meios complexos: meios que, além dos compostos químicos conhecidos, contém substâncias como hidrolisados protéicos, extrato de carne ou levedura (meio complexo simples). Ex.: caldo comum, ágar peptona;  
 Se a um meio complexo simples é adicionado soro, plasma, líquido ascítico ou sangue, obtém-se um meio complexo enriquecido ou melhorado. Ex.: ágar peptona + 10% de sangue = ágar sangue.
- Meios seletivos ou inibidores: são meios que permitem o desenvolvimento de um determinado microrganismo e inibem o desenvolvimento de outros ao agregar substâncias inibidoras como: sais biliares, NaCl, antibióticos etc. Ex.: ágar Chapman (contém uma elevada concentração de NaCl, permitindo o desenvolvimento de microrganismos halófitos – *Staphylococcus*);
- Meios diferenciais ou indicadores: meios adicionados de determinadas substâncias que evidenciam alguma característica do microrganismo. Ex.: caldo com lactose (permite visualizar a olho nu se a bactéria utilizou ou não a lactose presente no meio, com a conseqüente produção de ácido, o que pode ser visualizado através da mudança de cor do indicador de pH.
- Meio seletivo e indicador: Ex.: ágar Mac Conkey: seletivo, pois inibe os microrganismos Gram positivos (sais biliares e cristal violeta) e indicador, porque possui lactose e um indicador de pH.

Os meios de cultura para identificação presuntiva possuem indicadores de pH sensíveis à produção de ácidos. Assim, na presença de oxidação ou fermentação de um açúcar estes meios mudam de cor devido à acidificação do meio.

**INDICADORES DE pH E SUAS MUDANÇAS DE COR**

<b>Indicador</b>	<b>pH neutro</b>	<b>pH ácido</b>	<b>pH alcalino</b>
<b>Azul de bromotímol</b>	Verde	Amarelo	Azul
<b>Vermelho de fenol</b>	Alaranjado	Amarelo	Fúcsia (ou magenta)
<b>Púrpura de bromocresol</b>	Lilás	Amarelo	Púrpura (violeta)
<b>Vermelho neutro</b>	-	Vermelho	Amarelo

## TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS DE SEMEADURA E OBTENÇÃO DE CULTURAS PURAS

A semeadura microbiológica é um procedimento, mediante o qual se deposita (semeia-se), assepticamente, um microrganismo em um meio de cultura. Neste meio de cultura, os microrganismos multiplicam-se produzindo milhões de descendentes que formarão unidades macroscopicamente visíveis, denominadas **colônias**.

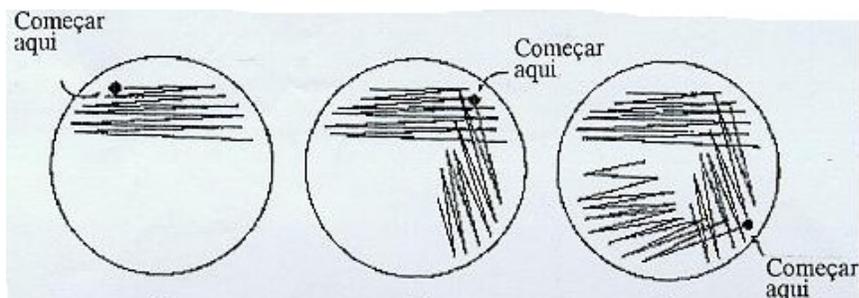
O material que contém os microrganismos que serão semeados recebe o nome de **inóculo** e este procedimento é realizado utilizando-se uma **alça de cultivo** ou uma pipeta.

Para realizar a semeadura, deve-se considerar o estado físico do meio de cultura. As semeaduras podem ser realizadas de:

- meio sólido para meio líquido;
- meio sólido para meio sólido;
- meio líquido para meio líquido;
- meio líquido para meio sólido.

- **Cultivo puro:** é aquele que contém somente um tipo de microrganismo e que se originou a partir de uma única célula.
- **Semeadura por estria ou disseminação (esgotamento):** consiste em passar a alça de cultivo contendo o inóculo sobre a superfície de uma placa de Petri, à qual contém o meio de cultura adequado para a bactéria que se deseja isolar. Ao passar a alça, fazendo estrias separadas umas das outras, objetiva-se que o inóculo seja diluído progressivamente de forma tal que, ao final das estrias, obtenha-se colônias isoladas.

✓ Semeadura por esgotamento:



- **Semeadura por diluição:** a uma mistura de microrganismos faz-se uma diluição seriada e, de cada diluição, realiza-se uma semeadura em placa. Apresenta uma grande desvantagem, que é o isolamento do microrganismo predominante na amostra.

Outros métodos de obtenção de culturas puras são:

- Semeadura por difusão em ágar fundido;
- Incubação em temperaturas elevadas ( $\geq 42^{\circ}\text{C}$ );
- Adição de substâncias químicas inibitórias (ex. antibióticos);
- Cultivos por enriquecimento.

## TIPOS DE CRESCIMENTO BACTERIANO

Os meios de cultura semeados são incubados a uma temperatura e requerimentos de O<sub>2</sub> próprios para cada microrganismo.

A forma de evidenciar o desenvolvimento microbiano nos meios líquidos é através da presença de:

- a) Turbidez uniforme;
- b) Sedimento;
- c) Floculação ou grânulos;
- d) Películas;
- e) Formação de gás;
- f) Viragem se solução indicadora de pH.

Em meios sólidos o crescimento bacteriano se evidencia pela formação de colônias, que podem apresentar, entre outras, as seguintes características:

### 1. Tamanho:

- a) puntiforme (< 0,5 mm);
- b) de maior tamanho (expresso em mm).

### 2. Forma:

- a) Circular;
- b) Irregular;
- c) Rizóide;
- d) Filamentosa.

### 3. Superfície:

- a) Plana;
- b) Meseta;
- c) Convexa;
- d) Côncava.

### 4. Consistência:

- a) Seca ou opaca;
- b) Úmida ou brilhante;
- c) Consistente (consistência similar a manteiga);
- d) Mucosa (quando tocada com alça forma um filamento);
- e) Quebradiça (crescimento seco, porém quebradiço, como esperma);
- f) Membranosa (difícil de suspender em água).

### 5. Pigmento:

Além das características mencionadas anteriormente, as colônias podem ou não apresentar pigmento, o qual pode estar circunscrito na colônia (endopigmento) ou pode estar difundido no meio (exopigmento).

### 6. Odor:

Algumas bactérias apresentam odor característico: amoniacal, fecaloídeo, adocicado etc.

## 7. Hemólise:

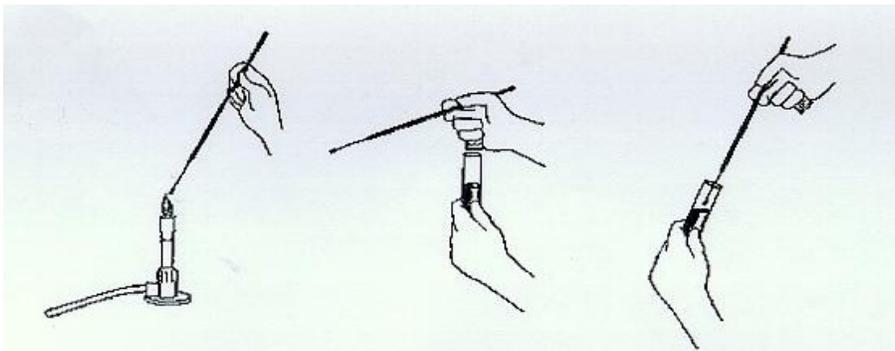
Quando se semeia em ágar sangue, as bactérias podem destruir os glóbulos vermelhos produzindo hemólise. Segundo esta característica, as bactérias podem ser:

- a) Gama hemolíticas: não destroem glóbulos vermelhos;
- b) Alfa hemolíticas: destruição parcial dos glóbulos vermelhos com formação de meta-hemólise que se evidencia por uma coloração esverdeada ao redor da colônia;
- c) Beta hemólise: destruição total dos glóbulos vermelhos que se evidencia pela transparência do meio ao redor da colônia.

## Atividade Prática: Cultura pura e isolamento bacteriano em meios líquidos e sólidos

### Técnica:

1. A alça de “platina” deve ser **flambada** antes e depois de qualquer procedimento de semeadura. Para tanto, o cabo deve ser exposto à chama de 2 a 3 vezes e a alça deve ser aquecida ao rubro. A posição correta para a flambagem da alça é que a mesma faça um ângulo de 45° em relação à mesa de trabalho;



2. Antes de retirar o material para a elaboração do esfregaço ou para semeadura, deve-se esfriar a alça na parede interna do tubo ou na tampa da placa de Petri;

3. Para a semeadura em tubos de ensaio, deve-se flambar rapidamente a boca dos mesmos logo após a retirada do tampão de algodão ou tampa rosqueada. Este deverá ser segurado pelo dedo mínimo da mão que está segurando a alça. Após a retirada do material com a alça, flambar novamente a boca do tubo e recolocar o tampão de algodão ou tampa. Flambar a alça após o uso;

4. As placas de Petri contendo meio sólido e os tubos contendo meio líquido deverão ser abertos próximos (máximo de “um palmo” de distancia) ao bico de Bunsen, para evitar contaminação, principalmente, das bactérias do ambiente. Depois de semeadas, as placas deverão ser incubadas em estufa com tampa voltada para baixo (emborcadas para evitar contaminação e ressecamento do meio).

#### **Objetivo da atividade:**

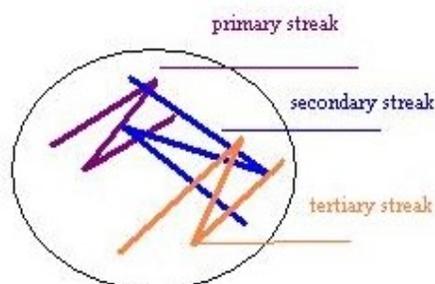
- 1) Realizar o isolamento de bactérias a partir de uma amostra aleatória (ambientes, pioderma, fezes, mão, celular, dinheiro, etc) em um meio de cultura sólido (placa petri contendo ágar nutriente estéril) de modo a obter colônias isoladas em cultura pura;
- 2) Realizar a coloração de Gram diretamente da amostra para fazer um diagnóstico presuntivo do provável agente bacteriano;
- 3) Isolar bactérias presentes na microbiota da mão e obter colônias isoladas em meio sólido ágar nutriente.
- 4) Semear e isolar bactérias cultivadas em meio líquido (caldo).

#### **Material:**

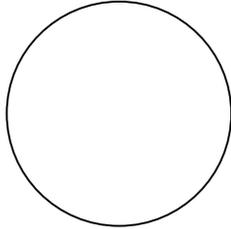
- 1 – Swab estéril;
- 2 – Caldo contendo cultivo bacteriano.
- 3 – Placa de Petri contendo meio de cultura sólido (ágar nutriente) estéril;
- 4 – Tubos contendo caldo de cultivo estéril;
- 4 – Alça bacteriológica;
- 5 – Lâminas de vidro;
- 6 – Corantes para Coloração de Gram
- 7 – Tubo com solução salina estéril
- 8 - Microscópio

#### **Procedimento 1: Cultivo e isolamento de bactérias das amostras**

- a) Depositar a amostra coletada com *swab* estéril na superfície de uma placa de ágar nutriente;
- b) Flambar (esterilizar) a alça;
- c) **Semear por esgotamento:** a partir de um ponto de inoculação, distribuir o material com a alça bacteriológica previamente esterilizada e esfriada, na placa de ágar estéril, fazendo “estrias ou zig-zag” no restante da placa. Este procedimento “separa/espalha” bactérias e, quando crescem, produzem colônias isoladas.



- d) Incubar a placa de ágar nutriente e o tubo com caldo nutriente a 37°C por 24 horas;
- e) **Fixar a amostra em uma lâmina de vidro e realizar a coloração de Gram;**
- f) **Desenhar a morfologia microscópica e coloração de Gram das bactérias observadas diretamente nas amostras;**



**Morfologia:**

**Gram:**

### **Procedimento 2: Cultivo e isolamento de bactérias em meios sólidos e líquidos**

- a) Flambar (esterilizar) a alça;
- b) Coletar amostra de caldo de cultura contendo bacterias com a alça estéril, e previamente esfriada, e depositar a amostra na superfície de uma placa de ágar nutriente;
- c) **Semear por esgotamento:** a partir de um ponto de inoculação, distribuir o material com a alça bacteriológica previamente esterilizada e esfriada, na placa de ágar estéril, fazendo “estrias ou zig-zag” no restante da placa. Este procedimento “separa/espalha” bactérias e, quando crescem, produzem colônias isoladas.
- d) Flambar (esterilizar) a alça;
- f) Coletar amostra de caldo de cultura contendo bacterias com a alça estéril, e previamente esfriada, e depositar a amostra no tubo contendo caldo de cultura estéril;
- g) Incubar a placa de ágar nutriente e o tubo com caldo nutriente a 37°C por 24 horas;

### **Procedimento 3: Cultivo de bactérias da Microbiota Humana**

**Objetivo:** constatar a presença e a variedade de microrganismos da nossa microbiota normal das mãos. Verificar o crescimento e diferentes morfológicas microscópicas e macroscópicas das colônias isoladas em placas de Petri contendo ágar nutriente estéril.

**Material:**

- Placa de Petri contendo meio de cultura sólido: 1 placa com ágar nutriente.

**Procedimento:**

1. Umedecer um cotonete (*swab* estéril) em um tubo contendo solução fisiológica estéril;
2. Coletar amostra das mãos (palmas e região interdigital) com o cotonete e fazer uma marca na superfície da placa contendo meio de cultura sólido (ágar nutriente);

3. A partir de um ponto de inoculação, distribuir o material na placa, fazendo “estrias ou zig-zag” no restante da placa. Incubar a placa a 37°C por 24 horas.

**A LEITURA E INTERPRETAÇÃO DAS CULTURAS SERÃO REALIZADAS NA PRÓXIMA AULA. DEPOIS DESTA INTERPRETAÇÃO SERÁ POSSÍVEL REALIZAR O RELATÓRIO DE ATIVIDADES.**

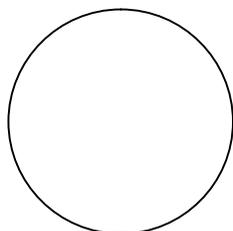
**Leitura da aula prática anterior com Coloração de Gram das colônias**

Amostras semeada e meio sólido, incubada a 37°C por 24h:

Descreva características das colônias isoladas no meio de cultura sólido e a morfologia microscópica e resultado da coloração de Gram das colônias crescidas em meio sólido.

- 1) Leitura da placa de ágar nutriente:

Características da colônia:

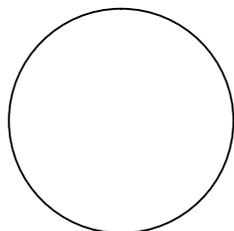


**Morfologia microscópica:**

**Gram:**

Cultura da amostra da mão semeada e meio sólido e incubada a 37°C por 24h:

- a) Tipo e número de colônias diferentes:  
b) Morfologia microscópica e coloração de Gram da colônia predominante



**Morfologia microscópica:**

**Gram:**

### **QUESTÕES PARA ESTUDO**

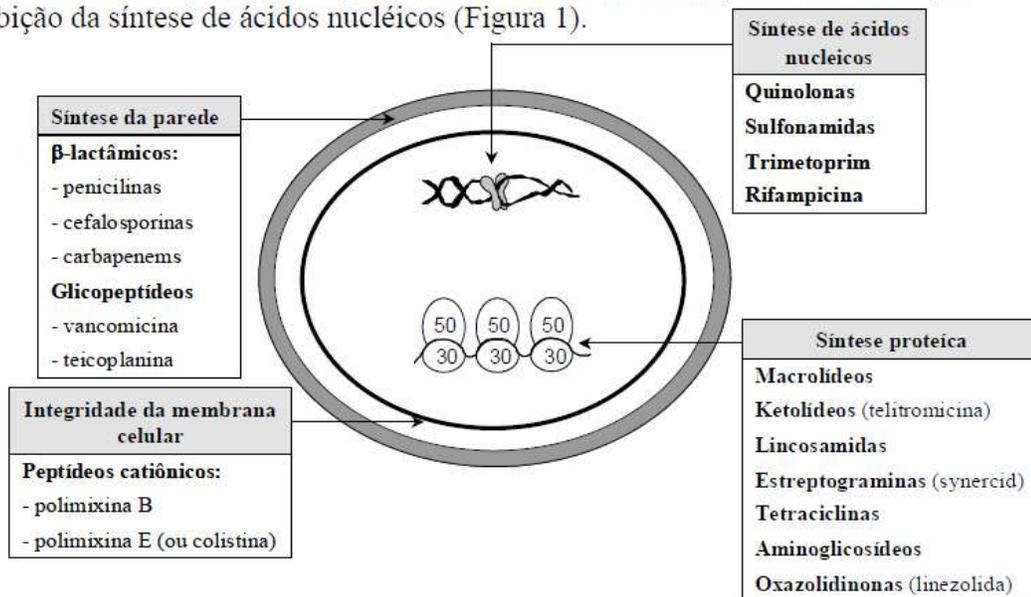
- 1. As amostras foram semeada em meio líquido (caldo) e meio sólido (em placas de Petri). Quais as vantagens que oferecem estes dois tipos de cultivos?**
- 2. É normal a presença de bactérias em partes do corpo humano como a mão?**
- 3. No caso que um Médico Veterinário realize uma cirurgia ou um processo invasivo em um animal, existe a probabilidade de que a bactéria da mão produza uma infecção no animal suscetível? Como poderia evitar a infecção?**
- 4. Em que caso clínico (infecção associada) a cultura quantitativa é importante para o diagnóstico?**

# AULA PRÁTICA Nº 3: ANTIBIÓTICOS E QUIMIOTERÁPICOS

## 1. Introdução

Desde a sua descoberta, o uso de antibióticos mudou o conceito da prática médica, revolucionando o tratamento de infecções e fazendo com que doenças fatais virassem problemas de saúde controláveis. Infelizmente, a resistência bacteriana de importância médica surgiu logo após a introdução dos primeiros antibióticos e desde então tem aumentado gradualmente em todo o mundo afetando principalmente o ambiente hospitalar, e estendendo-se para a comunidade e o agronegócio ligado à criação e produção de animais, o que é de interesse para a Medicina Veterinária e Zootecnia.

Antibacterianos são definidos como compostos de baixo peso molecular, produzidos por bactéria e fungos (antibióticos), ou compostos sintéticos ou quimicamente modificados (quimioterápicos) que matam (bactericidas) ou inibem (bacteriostáticos) o crescimento de bactérias. Estruturalmente, são classificados como  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas, macrolídeos, lincosamidas, tetraciclina, polimixinas, sulfonamidas, glicilciclina, oxazolidinonas, cetolídeos, glicopeptídeos, lipopeptídeos e estreptograminas. Segundo o espectro de atividade eles possuem um espectro restrito de atividade contra Gram negativos ou Gram positivos, ou um amplo espectro de atividade contra Gram positivos e Gram negativos. O mecanismo de ação, o qual pode produzir um efeito bacteriostático ou bactericida, é direcionado à inibição da síntese da parede bacteriana, alteração da integridade da membrana, inibição da síntese proteica, ou inibição da síntese de ácidos nucleicos (Figura 1).



Com a finalidade de praticar uma antibioticoterapia racional, surgiram os testes de suscetibilidade antibacteriana (ou Antibiograma), cujo objetivo é prever *in vitro* o que acontecerá *in vitro* quando um antibiótico seja administrado, na instauração de um esquema terapêutico, para o tratamento de doenças infecciosas. Atualmente, existem métodos qualitativos (i.e., método de difusão do disco ou Kirby-Bauer) que permitem diferenciar se uma bactéria é resistente ou sensível a um determinado antibiótico testado. Adicionalmente existem métodos quantitativos que permitem conhecer se uma bactéria é sensível ou resistente, mediante a de terminação da Concentração Inibitória Mínima

(CIM). Este valor infere quantitativamente sobre a concentração mínima necessária para inibir, *in vitro*, o crescimento macroscópico de uma espécie bacteriana. O valor da CIM é expressa em unidades de  $\mu\text{g/mL}$  (ou  $\text{mg/L}$ ) e permite, além de instaurar uma terapia baseada em dosagens apropriadas, monitorar a evolução da resistência de um agente bacteriano, durante o processo infeccioso. Com relação a isto, a instauração de uma antibioticoterapia se baseia em administrar uma concentração de antibiótico que permita obter uma concentração plasmática SEMPRE superior a CIM.

## 2. Objetivos

Interpretar um teste de suscetibilidade antibacteriana qualitativo (Antibiograma realizado pelo método de difusão do disco) e discernir sobre a escolha de cada antibiótico, tanto para a execução do teste, como para a escolha terapêutica.

## 3. Experimental

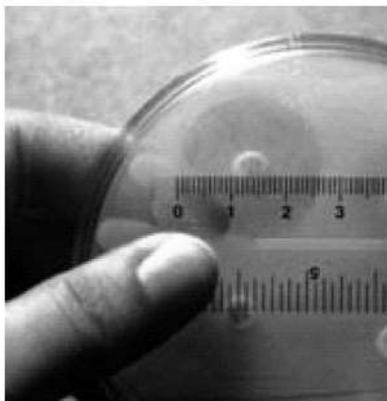
Cada grupo receberá:

1. Caldo nutriente inoculado com *Staphylococcus aureus*
2. Caldo nutriente inoculado com *Escherichia coli*
3. Placas de ágar **Mueller-Hinton**
4. Coletar amostra bacteriana com ajuda do “swab” estéril. Tirar o excesso de líquido pressionando o “swab” nas paredes do tubo.
5. Semear a superfície do ágar Mueller-Hinton (cobrindo a totalidade da superfície) com cada amostra bacteriana, utilizando o “swab” umedecido no inoculo bacteriano respectivo. Uma placa para *S. aureus* e uma placa para *E. coli*.
6. Deixar secar as placas por 5 minutos e depositar discos de antibióticos de diferentes classes estruturais (Penicilina, Eritromicina, Ac. Nalidixico, Cefotiofur, Enrofloxacina).
7. Identificar as placas e incubar ( $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas).

**A LEITURA E INTERPRETAÇÃO DOS ANTIBIOGRAMAS SERÃO REALIZADAS NA PRÓXIMA AULA. DEPOIS DESTA INTERPRETAÇÃO SERÁ POSSÍVEL REALIZAR O RELATÓRIO DE ATIVIDADES.**

### Leitura da aula prática anterior

Com o auxílio de uma régua (figura 2), cada grupo deverá medir o halo de inibição (em milímetros) para cada antibiótico, completando a tabela 1.



**Tabela 1.** Interpretação dos halos de inibição para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

Antibióticos*	Disco (µg)	Critério de Interpretação						Diâmetro do halo lido (mm)	Interpretação do isolado estudado
		Sensível		Intermediário		Resistente			
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>		
Penicilina	PEN (10)	-	≥ 29	-	-	-	≤ 28		
Eritromicina	ERI (15)	-	≥ 23	-	14-22	-	≤ 13		
Ac. Nalidixico	NAL (30)	≥ 19	-	14-18	-	≤ 13	-		
Enrofloxacina	ENO (5)	≥ 23	≥ 23	17-22	17-22	≤ 16	≤ 16		
Ceftiofur	CTF (30)	≥ 21	≥ 21	18-20	18-20	≤ 17	≤ 17		

\* **Penicilinas:** penicilina; **Cefalosporinas:** ceftiofur; **Macrólídeos:** eritromicina; **Quinolonas:** Ac. Nalidixico, enrofloxacina. (Penicilina e Cefalosporinas são beta-lactâmicos)

### QUESTÕES PARA RELATÓRIO AULA PRÁTICA Nº6

a) Cite critérios de seleção na escolha dos antibacterianos para realizar um teste de suscetibilidade.

b) Segundo o antibiograma, mencione quais antibióticos são de amplo espectro e quais são de espectro restrito.

c) Observando os resultados, em um caso de mastite bovina por *S. aureus*, que antibióticos poderiam ser utilizados no tratamento?

### PRINCIPAIS ANTIBIÓTICOS CLASSIFICAÇÃO

#### PENICILINAS

- Naturais:
  - Penicilina G (via oral ou intramuscular).
  - Penicilina G Sódica o Potássica (endovenosa).
  - Penicilina V (via oral).
- Penicilinas resistentes às penicilinases.
  - Meticilina (via parenteral).
  - Isoxazolipenicilinas.
    - Cloxacilina (via oral).
    - Oxacilina (via parenteral ou oral).
- Aminopenicilinas.
  - Ampicilina (via parenteral).
  - Amoxicilina (via oral).
- Penicilinas antipseudomonas:
  - Carboxipenicilinas
    - Ticarcilina (via parenteral).
  - Ureidopenicilinas de espectro estendido.
    - Piperacilina (via parenteral).

## CEFALOSPORINAS

- **De Primeira Geração:**
  - via oral:
    - Cefalexina.
    - Cefadroxilo.
  - via parenteral:
    - Cefalotina (EV).
    - Cefazolina (EV o IM).
- **De Segunda Geração**
  - via oral:
    - Cefaclor.
    - Cefuroxima.
  - via parenteral:
    - Cefuroxima.
    - Cefamicinas.
      - Cefoxitina.
      - Cefotetan.
- **De Terceira Geração**
  - via oral:
    - Cefpodoxima.
  - via parenteral:
    - Cefotaxima.
    - **Ceftiofur**
    - Ceftriaxona
    - Ceftazidima\*
    - Cefoperazona\*
- **De Quarta Geração**
  - Cefepime.
  - Cefpiroma.

\* Activos Contra Pseudomonas.

## MONOBACTÁMICOS

- Aztreonam.

## CARBAPENEMS

- Imipenem.
- Meropenem
- Ertapenem.
- Doripenem.

## INIBIDORES DAS BETA-LACTAMASAS

- Acido clavulánico.
- Sulbactam.
- Tazobactam.

## MACROLÍDEOS

## ANTIGOS MACROLÍDOS

- Eritromicina.

## NOVOS MACROLÍDEOS

- Claritromicina.
- Azitromicina.

## CETOLÍDEOS

- Telitromicina.

## AMINOGLICOSÍDEOS

### PRIMEIRA GERAÇÃO

- Estreptomicina.
- Neomicina.
- Kanamicina.

### SEGUNDA GERAÇÃO

- Gentamicina.
- Amikacina.
- Netilmicina.
- Tobramicina.

## QUINOLONAS

### ANTIGAS QUINOLONAS

- Acido Nalidíxico.
- Acido Pipemídico.

### NOVAS QUINOLONAS

- Norfloxacin.
- Enrofloxacin (Uso exclusivo Veterinário)
- Ciprofloxacin.
- Ofloxacin.
- Levofloxacin.

## SULFONAMIDAS

- De eliminação rápida: .

- Sulfametazina
- **De eliminação média.**
  - Sulfametoxazol: de uso freqüente combinado com o trimetoprim (*BACTRIM*).
  - Sulfadiazina.
- **De ação intestinal.**
  - Sulfaguanidina.
  - Succinilsulfatiazol.
  - Sulfasalazina: utilizado no tratamento da colite ulcerosa.
- **De uso Tópico.**
  - Sulfacetamida: se utiliza em solução oftálmica para conjuntivites.
  - Sulfadiazina argéutica: se utiliza em queimaduras.

### TRIMETOPRIMA

Inibe a enzima dihidrofolato redutase, provocando uma interferência no ácido fólico com posterior síntese de pirimidina na célula bacteriana.

### TETRACICLINAS

#### PRIMEIRA GERAÇÃO

- **Sintéticas**
  - Tetraciclina HCL.

#### SEGUNDA GERAÇÃO

- **Semisintéticas:**
  - Doxiciclina.
  - Minociclina.

#### TERCEIRA GERAÇÃO

- Glicilciclinas.
  - Tigeciclina (9-t-butilglicilamido derivado da minociclina).

### FENICOES

- Cloranfenicol.

### NITROIMIDAZOL

- Metronidazol.

### AÇUCARES COMPLEXOS

- Lincomicina.
- Clindamicina.

## FARMACOS PARA O TRACTO URINÁRIO

- Nitrofurantoina (nitrofurano).

## POLIMIXINAS

- Polimixina B .
- Colistin ou Polimixina E.

## OXAZOLIDINONAS

- Linezolid.

## GLICOPEPTÍDEOS

- Vancomicina.
- Teicoplanina.

## ESTREPTOGRAMINA Y LIPOPEPTIDEOS

### ESTREPTOGRAMINAS

- Quinupristina - dalfopristina.

### LIPOPEPTIDOS

- Daptomicina.

## RIFAMICINAS

- Rifampicina.

## AULA PRÁTICA Nº 4

### **Antibiograma quantitativo. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

[https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede\\_rm/cursos/atm\\_racional/modulo2/metodos2.1.htm](https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo2/metodos2.1.htm)

#### Microdiluição em caldo

A microdiluição em caldo corresponde à miniatura da técnica de diluição. Ao contrário da anterior, a microdiluição em caldo utiliza placas de Elisa estéreis, com 96 poços, com o fundo em formato de “U”, para permitir a melhor visualização do crescimento bacteriano.

A vantagem deste método, em relação ao da diluição em tubo, é que em uma placa podemos testar uma bactéria utilizando um número variável de antimicrobianos, em torno de 12 drogas, com distintas concentrações (4 a 8 diluições logarítmicas).

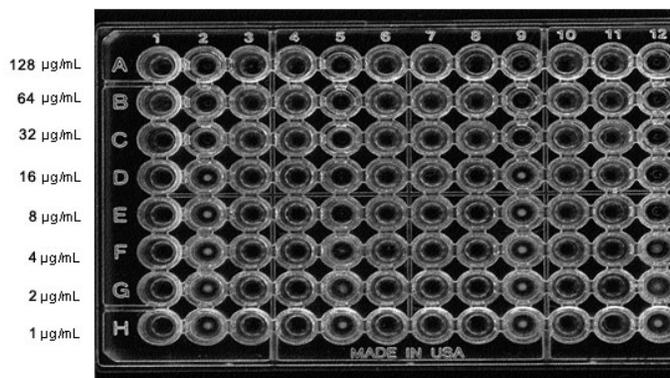
As placas de microdiluição podem conter o antimicrobiano liofilizado ou congelado e são inoculadas com o auxílio de um dispositivo plástico, para obter uma concentração bacteriana final de aproximadamente  $5 \times 10^4$  a  $10^5$  UFC/mL em cada poço da placa de microdiluição.

Os painéis de microdiluição, após a inoculação, são incubados a 35°C por 16 a 20 horas ou de acordo com o microrganismo em teste:

Para *Streptococcus* spp., o período de incubação deve ser de 20 a 24 horas;  
para cepas de *Staphylococcus* spp. e *Enterococcus* spp., a incubação deve ser realizada por um período de 24 horas completas para avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos oxacilina e vancomicina.

Após a incubação, a leitura da placa com a determinação da CIM será realizada visualmente (Figura). A interpretação é feita da mesma forma que a da macrodiluição.

Esta metodologia é bastante utilizada pelos laboratórios de microbiologia clínica em países desenvolvidos, pois o processo de confecção das placas é mecanizado e a comercialização de placas de microdiluição congeladas ou liofilizadas é realizada por vários fabricantes. O teste quantitativo de microdiluição em caldo é utilizado pelos sistemas automatizados, podendo ser combinado com a identificação da espécie bacteriana pela incorporação de provas bioquímicas na mesma placa.



## AULA PRÁTICA Nº 5

### **MÉTODOS FÍSICOS E QUÍMICOS DE DESTRUIÇÃO MICROBIANA (avaliação de antissépticos e desinfetantes em função da concentração e tempo de interação).**

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, elevada osmolaridade (empregando-se altas concentrações de sal ou de açúcar), pH baixo e as radiações. Ainda poderíamos acrescentar a filtração de soluções, que embora não iniba ou mate os microrganismos, permite a remoção destes e conseqüente esterilização do material. 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 são estudados na prática que aborda o **antibiograma**. Quanto ao emprego, a diferença fundamental entre os antibióticos e os demais agentes químicos antibacterianos, reside no fato de que os primeiros possuem **toxicidade seletiva** e, assim, podem ser introduzidos no organismo em doses controladas que não causem danos à célula animal. Os demais agentes químicos são agressivos às células e só podem ser utilizados para a desinfecção de instrumentos e de superfícies inanimadas (**desinfetantes**) ou na antisepsia da pele ou das mucosas (**antissépticos**).

### **ESTERILIZAÇÃO:**

Conjunto de procedimentos físicos, químicos ou biológicos que têm por objetivo a destruição total de microrganismos saprófitos e patógenos, tanto em sua forma vegetativa como esporulada.

A eliminação dos microrganismos pode ser realizada por:

- a) Destruição: esterilização por calor, radiações, agentes químicos, produtos antimicrobianos.
- b) Eliminação ou separação dos microrganismos indesejáveis: filtração, centrifugação e ultracentrifugação.
- c) Inibição do desenvolvimento: baixas temperaturas (refrigeração e congelamento), dessecação, aplicação de antimicrobianos etc.

### **CLASSIFICAÇÃO DOS MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO:**

#### **I - MÉTODOS FÍSICOS:**

##### **a) Temperatura:**

###### ● Calor seco:

- ✓ direto (incineração, flambar);

- ✓ ar quente (forno Pasteur).
- Calor úmido:
  - ✓ com pressão (autoclave);
  - ✓ sem pressão (ebulição, pasteurização, tidalização).
- Frio: refrigeração, congelamento, liofilização.

**b) Filtração;**

**c) Centrifugação e ultracentrifugação;**

**d) Radiações:** luz ultravioleta, raios X;

**e) Ondas supersônicas (ultrassom);**

**f) Pressão osmótica.**

**II - MÉTODOS QUÍMICOS:**

- a) Desinfecção;
- b) Antissepsia.

**III - MÉTODOS BIOLÓGICOS:**

- a) Drogas antimicrobianas;
- b) Bacteriocinas;
- c) Bacteriófago.

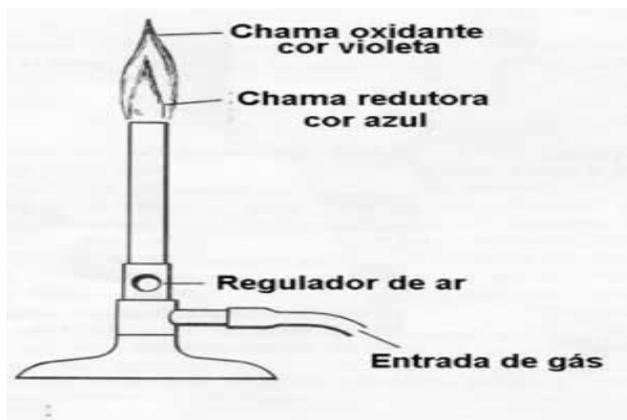
**MÉTODOS FÍSICOS**

**ESTERILIZAÇÃO POR CALOR SECO**

- a) Calor direto:

Utilizado na esterilização de material metálico ou de vidro (alça de platina, pipetas Pasteur, boca dos tubos de ensaio, etc.). Deve-se passar o material a ser esterilizado pela zona azul da chama do bico de Bunsen. Este método se denomina flambar.

Outra aplicação de calor direto é a incineração ou cremação, método utilizado para a eliminação de material descartável (expectoração, fraldas, cadáveres, material contaminado etc.).



b) Ar quente:

Forno Pasteur – funciona a 180°C por 30 min a 1 h (tempo efetivo). Neste forno são destruídas tanto as formas vegetativas como as esporuladas das bactérias, além de outros microrganismos, como todos os vírus. Pode-se esterilizar materiais de vidro, porcelana, agulhas etc. Estes devem estar bem secos. Líquidos, meios de cultura e material orgânico não podem ser esterilizados nesse forno.

## ESTERILIZAÇÃO POR CALOR ÚMIDO

Numa mesma temperatura o calor úmido é mais efetivo que o calor seco. A parte ativa do calor úmido é o vapor d'água. O calor úmido pode ser aplicado:

- a) Sem pressão;
- b) Com pressão.

a) Vapor de água sem pressão:

**Ebulição da água:** consiste em aquecer a água em um recipiente (panela, esterilizador) até a ebulição, mantendo por 10 – 15 min.

Este método, ainda que prático e muito utilizado para esterilizar agulhas, seringas e outros, como também para destruir as formas vegetativas das bactérias, não possui ação sobre esporos nem sobre alguns vírus.

**Pasteurização:** não produz esterilização apenas destrói microrganismos patógenos. Consiste no aquecimento de um líquido por um tempo determinado, seguido de um rápido resfriamento. Este método, utilizado em leite, destrói todas as bactérias patógenas que podem estar contaminando o mesmo, porém, mantém intactas suas propriedades nutritivas e sabor.

O processo pode ser aplicado em diferentes níveis:

- LT.LT (low temperature, long time) : 65°C por 30 min;
- HT.ST (high temperature, short time) : 72°C por 15s e esfriamento a 10°C;
- VHT (ultra high temperature) : 130-150°C por 5s.

**Tindalização:** é um sistema de esterilização fracionada no qual o produto é levado à ebulição por 30 min em três dias consecutivos. Isto leva à destruição de esporos que vão germinando dia-a-dia.

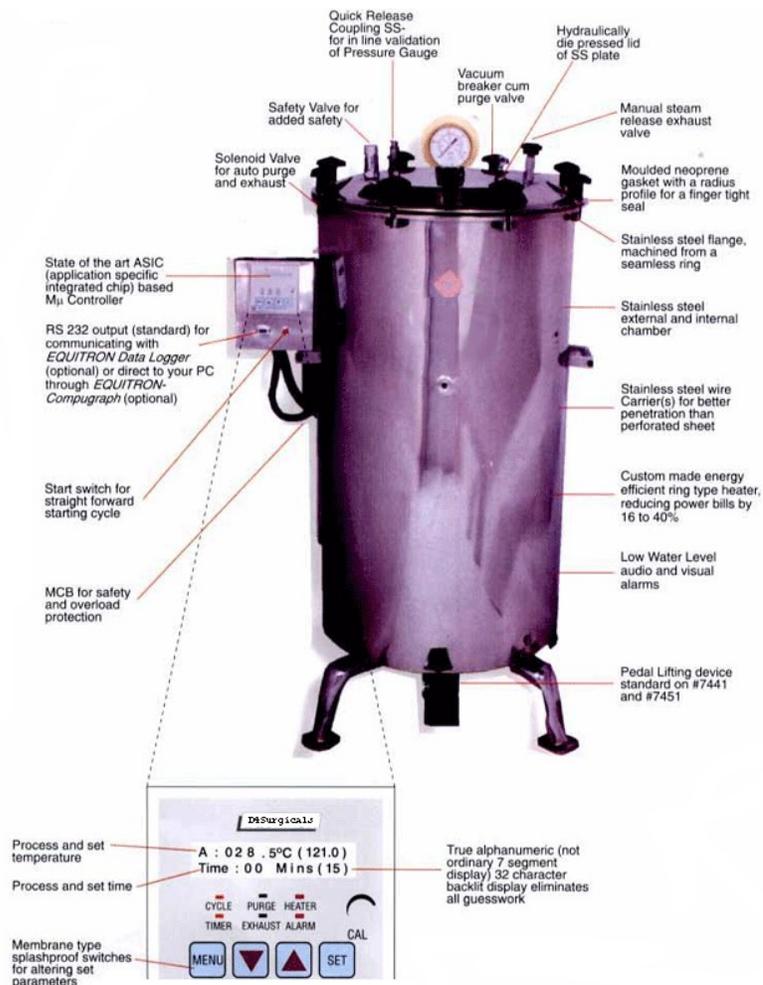
É utilizado para esterilizar líquidos que contém substâncias orgânicas.

b) Vapor de água com pressão:

**Autoclave de Chamberland:** é um recipiente metálico, cilíndrico, no qual coloca-se certa quantidade de água que é aquecida por meio de eletricidade ou gás. É fechada hermeticamente com uma tampa metálica que se ajusta por meio de parafusos ou alavanca.

A autoclave possui um manômetro indicador de pressão, uma válvula de segurança e uma chave de saída de vapor de ar. Quando em funcionamento, deve-se deixar o vapor escapar, até que saia de forma contínua. Em seguida, deve-se fechar a chave de saída.

O aumento da temperatura da água no interior da autoclave acarreta o aumento da pressão. A temperatura de esterilização habitual é de 115-120°C durante 20 min. (1 atm de pressão).



Este é o método mais seguro e rápido de esterilização, podendo ser utilizado em uma grande variedade de materiais como meios de cultura, material contaminado, vidros, borrachas etc.

O controle da esterilização pode ser realizado utilizando-se diversos procedimentos como: substâncias químicas que se fundem a temperaturas conhecidas, indicadores que mudam de cor em determinadas temperaturas, tiras de papel que contém esporos bacterianos e que devem ser cultivados posteriormente, onde poderá ser observado possível desenvolvimento etc.

## TEMPERATURAS BAIXAS

As temperaturas baixas inibem o desenvolvimento microbiano e os microrganismos permanecem nestas condições durante longos períodos, em vida latente. Quando há aumento de temperatura, a multiplicação microbiana é retomada. Trata-se, portanto, de um processo reversível. A técnica é empregada na conservação de alimentos (carnes, verduras, etc.), cepas bacterianas etc.

- ✓ Refrigeração: temperatura de + 4°C;
- ✓ Congelamento: temperatura abaixo de 0°C.

## LIOFILIZAÇÃO

É um processo de desidratação realizado a baixas temperaturas (de congelamento) a vácuo.

Utilizada para conservação de cepas microbianas, vírus, vacinas, soros etc.

## FILTRAÇÃO

Separação ou eliminação de microrganismos dos materiais os quais se deseja esterilizar; não há destruição nem inibição de microrganismos.

A filtração é utilizada para esterilizar líquidos ou gases que não resistem ao calor.

São utilizados filtros e os procedimentos empregados podem ser por pressão ou aspiração.

## ULTRAFILTROS

São constituídos por membranas, proporcionando/formando poros muito pequenos. Existem ultrafiltros de diferentes porosidades, de acordo com as características dos componentes da mistura. Sua utilidade foi estabelecida na medição de vírus filtráveis.

## CENTRIFUGAÇÃO E ULTRACENTRIFUGAÇÃO

São também meios utilizados para a separação de microrganismos de um produto, a qual se obtém devido à diferença de densidade entre os mesmos.

## RADIAÇÕES

**Luz ultravioleta:** a luz ultravioleta possui boa ação germicida, porém pouco poder de penetração.

Na prática, a fonte de luz ultravioleta é obtida com lâmpadas especiais. Suas aplicações são:

- Esterilização de ambientes: laboratórios, hospitais, centro cirúrgico etc;
- Água de piscinas e água de bebidas;

- Bancos de sangue;
- Esterilização de vasilhas.

**Raios X:** são microbidas e possuem alto poder de penetração, porém sua aplicação é cara e são, além disso, cancerígenos, por isso seu emprego para esterilização é contraindicado.

**Radiações iônicas:** possuem menor comprimento de onda que a luz ultravioleta e, por sua vez, maior poder germicida, que aumenta em presença de oxigênio, possivelmente devido à formação de peróxido.

A fonte de radiação mais utilizada é obtida do Cobalto-60.

Sua maior aplicação é na esterilização e preservação de alimentos. Contudo, o alto custo do procedimento faz com que seu uso seja restrito.

## ONDAS SUPERSÔNICAS

Os sons não audíveis para o ouvido humano (frequência 20000 a 100000/segundo) também possuem ação letal sobre as bactérias quando estas se encontram em suspensão. A ação sobre os vírus é bem menor.

Têm pouca aplicação prática devido a variabilidade de resposta dos diferentes microrganismos às ondas supersônicas.

## PRESSÃO OSMÓTICA

Uma alta pressão osmótica (alta concentração de NaCl ou outras substâncias) confere ação estática e/ou microbida ao meio. Entretanto, algumas bactérias suportam altas concentrações de sais, sendo denominadas bactérias halofílicas.

A pressão osmótica tem aplicação na preservação de alimentos:

- Salmão, carne, pickles etc (agregação de sal);
- Geléias, frutas, xaropes, etc (agregação de açúcar).

## MÉTODOS QUÍMICOS

Existem certas substâncias químicas que possuem a propriedade de destruir os microrganismos. A destruição, inibição ou morte dos microrganismos tem importância na medicina, na pesquisa e na indústria.

**Desinfecção:** processo através do qual eliminam-se microrganismos patogênicos.

**Antissepsia:** é todo processo que destrói ou inibe o desenvolvimento de microrganismos com a finalidade de combater a infecção (sepsia). Geralmente, empregam-se substâncias químicas.

**Contaminação:** é a presença de microrganismos vivos na superfície do corpo, solo, água, alimentos, etc.

**Antisséptico e desinfetante:** são substâncias que têm por objetivo a eliminação efetiva dos microrganismos. Ainda que, etimologicamente, possuam o mesmo significado, na prática, há diferença entre os conceitos:

Antisséptico: é uma substância que interfere no desenvolvimento da infecção devido a sua propriedade em inibir o desenvolvimento microbiano (ação bacteriostática). Uma substância antisséptica não é tóxica para os tecidos vivos.

Desinfetantes: são substâncias com ação antimicrobiana (ação bactericida e/ou bacteriostática), mas que, geralmente, possuem efeitos tóxicos sobre os tecidos vivos.

**Bactericida**: propriedade de uma substância em produzir a morte microbiana.

**Bacteriolítica**: propriedade de uma substância em produzir, além da morte, a destruição das bactérias.

**Bacteriostática**: propriedade de uma substância em inibir o desenvolvimento bacteriano (fenômeno reversível).

## LOCAIS E MECANISMOS DE AÇÃO DOS AGENTES QUÍMICOS

Os locais e mecanismos através dos quais a substância química mata, destrói ou inibe os microrganismos são os seguintes:

### 1) Ação sobre membrana e parede celular:

- Dificultando sua síntese. Ex. lisozimas, penicilina.
- Por combinação com os lipídios da membrana. Ex. álcool, fenol, detergentes.
- Inibição da cadeia transportadora de elétrons. Ex. hexaclorofeno.

### 2) Ação sobre proteínas e enzimas:

- Coagulação e desnaturação de proteínas. Ex. álcool, fenol, metais pesados.
- Efeito tóxicos sobre enzimas:
  - a) Oxidação de radicais livres. Ex.  $H_2O_2$ , iodo, cloro.
  - b) Efeito alquilante. Ex. formaldeído, glutaraldeído, óxido de etileno.
- Formação de compostos com:
  - a) radicais livres. Ex. mercuriais.
  - b) grupos sulfidrilas. Ex. compostos contendo cloro.
  - c) grupos amino. Ex. formol, glutaraldeído.

### 3) Alteração do cromossomo:

- Interferência na replicação do DNA. Ex. formaldeído, radiações.

## OS AGENTES QUÍMICOS DE DESINFECÇÃO SÃO AGRUPADOS EM:

1. Álcoois;
2. Fenóis (hexaclorofeno, clorexidine);
3. Íons de metais pesados (cloreto de mercúrio, nitrato de prata, sulfato de cobre);
4. Agentes oxidantes (cloro, hipoclorito de cálcio ou sódio, tintura de iodo, peróxido de hidrogênio, permanganato de potássio);
5. Agentes alquilantes (formaldeído, glutaraldeído, óxido de etileno);
6. Detergentes ou agentes tensoativos (derivados do amônio quaternário: cloreto de benzalcônio, cetritane);
7. Corantes (violeta de genciana, azul de metileno, verde brilhante, verde malaquita).

**A EFICÁCIA DESTAS SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS, COMO DESINFETANTES, É AFETADA PELOS SEGUINTE FATORES:**

1. Concentração;
2. Tempo de exposição;
3. pH;
4. Temperatura;
5. Microrganismo;
6. Presença de matéria orgânica.

**PARA QUE UMA SUBSTÂNCIA QUÍMICA SEJA UTILIZADA COMO DESINFETANTE OU ANTISSÉPTICO DEVE REUNIR OS SEGUINTE REQUISITOS:**

1. Alto poder germicida;
2. Estabilidade/ Ser estável;
3. Solubilidade/ Ser solúvel;
4. Não ser tóxico aos tecidos;
5. Bom poder de penetração;
6. Não ser irritante, não possuir odor desagradável, não ser corrosivo;
7. Não manchar;
8. Baixo custo.

**ATIVIDADE PRÁTICA**

**A) 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.

**Procedimento:**

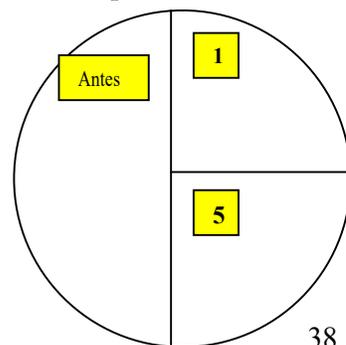
1. Divida o fundo da placa de Petri em 3 partes. Anote: ANTES, 1 minuto, 5 minutos; nome do microrganismo e o número do Grupo;

2. Inocule uma alçada da suspensão bacteriana no espaço ANTES;

3. Adicione 1,0 ml de Desinfetante. Misture bem 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.



**Análise / Interpretação:**

1. Contar e anotar o número de colônias de bactérias crescidas.  
Caso seja impossível a contagem, anotar os resultados na forma de cruces;
1. Comparar os resultados de seu grupo com os resultados dos demais grupos que trabalharam com diferentes desinfetantes;
2. No item Conclusão de seu relatório, incluir observações relativas aos resultados obtidos pelo seu grupo e os resultados obtidos por demais grupos do laboratório.

**QUESTÕES PARA RELATÓRIO**

**1. Os desinfetantes são capazes de promover a esterilização das bactérias? O tempo de incubação é um fator que deve ser considerado?**

**3. Defina, especificando a diferença:**

- Antibiótico, desinfetante e antisséptico;
- Esterilização e desinfecção.

## DESINFETANTES E ANTISSÉPTICOS MAIS UTILIZADOS E SUAS CARACTERÍSTICAS

GRUPO	EXEMPLO	MODO DE AÇÃO	USOS E CONCENTRAÇÃO RECOMENDADA	INDICAÇÕES
Álcoois	Etílico Isopropílico	Desnatura proteínas, dissolve lipídios da membrana, tensoativo.	Desinfetante e antisséptico da pele. 70%.	Não atua sobre esporos. Efeito: 10-15'. Atua sobre células vegetativas Gram(+) e (-), vírus, fungos, mas não esporos.
Fenol	Fenol, cresol, lisol.	Desnatura proteínas. Diminui tensão superficial.	Desinfetante para equipos, instrumentos, lixeiras, etc. 5%.	Muito tóxico e corrosivo, de odor desagradável, efeito imediate. Atua sobre Gram (+),(-) e BAAR.
	Hexaclorofeno	Tensoativo, desnatura proteínas.	Antisséptico incorporado a sabonetes, desodorantes, creme dental.	Absorvido pela pele, menos tóxico.
	Clorexidina	Tensoativo, desnatura proteínas.	Assepsia pré-cirúrgica de feridas.	Não é absorvido pela pele.

## DESINFETANTES E ANTISSÉPTICOS MAIS UTILIZADOS E SUAS CARACTERÍSTICAS

GRUPO	EXEMPLO	MODO DE AÇÃO	USOS E CONCENTRAÇÃO RECOMENDADA	INDICAÇÕES
Metais pesados	Cloreto de mercúrio	Inativa enzima, une-se a –SH livres de enzimas ou coenzimas.	Desinfetante de laboratório. 0,1%.	Muito tóxico, corrosivo, é inativado em presença de matéria orgânica.
	Mercuriais orgânicos: Mertiolate, mercúrio cromo.	Idem	Antisséptico da pele e mucosas. 1 – 2,5%.	Menos tóxico, não sendo inativado em presença de matéria orgânica. Não atua sobre esporos e BAAR.
	Nitrato de prata.	Idem	Antisséptico da pele e mucosas. 1%.	
	Sulfato de cobre.	Idem	Desinfecção de depósitos de água.	

## DESINFETANTES E ANTISSÉPTICOS MAIS UTILIZADOS E SUAS CARACTERÍSTICAS

GRUPO	EXEMPLO	MODO DE AÇÃO	USOS E CONCENTRAÇÃO RECOMENDADA	INDICAÇÕES
Agentes oxidantes	Cloro, hipoclorito de sódio ou cálcio.	Oxidam grupos –SH e –NH <sub>2</sub> .	Purificação de água, desinfecção de artefatos empregados em indústria láctea. 5%.	Efeito imediato, irritante, tóxico, pouco ativo sobre esporos. Ativo sobre Gram (+),(-) e BAAR. São inativados em presença de matéria orgânica.
	Iodo	Idem	Utiliza-se na forma de tintura (solução em álcool). Desinfecção cutânea. 2%.	Efeito imediato, ativo contra Gram (+),(-) e BAAR. Não age sobre esporos. Não irritante, não mancha, efeito imediato.
	Compostos orgânicos de iodo.		Desinfetante, antisséptico da pele e feridas.	Pouco poder de penetração. É inativado em presença de matéria orgânica.
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Diminui tensão superficial. Oxida grupos –SH.	Antisséptico da pele, limpeza de feridas. 3 – 20%.	

## DESINFETANTES E ANTISSÉPTICOS MAIS UTILIZADOS E SUAS CARACTERÍSTICAS

GRUPO	EXEMPLO	MODO DE AÇÃO	USOS E CONCENTRAÇÃO RECOMENDADA	INDICAÇÕES
Agentes alquilantes	Formaldeído	Substituem átomos livres de hidrogênio por radicais alquila, alterando a estrutura de proteínas e DNA.	Desinfetante de laboratórios, instrumentos cirúrgicos e equipamentos contaminados. Solução a 37%.	Esporocida, utilizado na forma gasosa por tempo prolongado.
	Óxido de etileno	Idem	Utilizado para esterilizar material plástico, papel, lã, couro.	Gás altamente tóxico e explosivo. Utilizado misturado a CO <sub>2</sub> . Necessita uma autoclave especial, com 8 – 12h de exposição.
Detergentes	Aniônicos	Rompem a membrana celular, aumentam permeabilidade e diminuem a tensão superficial.	Desinfetam pele e mucosas. 10 – 30 min.	Não possuem ação sobre esporos e BAAR.  Idem
	Catiônicos Compostos de amônio quaternário. Cloreto de benzalcônio. Cetritane.	Idem	Idem	
Corantes básicos	Cristal violeta, verde-brilhante	Interferem com os ácidos nucléicos.	Antisséptico da pele e membranas.	

## **AULA PRÁTICA Nº 6**

### **TRANSMISSÃO E DISSEMINAÇÃO DE MICROORGANISMOS**

A infecção é uma condição na qual uma parte (infecção localizada), ou o corpo todo (infecção disseminada) é invadido por um agente infeccioso que, numa situação favorável, multiplica-se, causando dano às células do hospedeiro, com evidentes prejuízos para este. O organismo infectante ou patógeno interfere na fisiologia normal do hospedeiro e pode levar a diversas consequências.

A resposta do hospedeiro é a inflamação [amidalite, sufixo -ite (do grego itis ou ite) é inflamação, peritonite, otite, sinusite, uretrite, conjuntivite etc.].

Baseado no conceito de que todo lugar está colonizado por microrganismos, e que todo indivíduo apresenta uma microbiota normal, podemos deduzir que existem fontes endógenas e exógenas de infecção e que as infecções podem ser transmitidas por contato direto (mãos, portadores, aerossóis, secreções) e indireto [alimentos, fômites (ex. toalhas), artrópodes, vegetais, solo].

#### **Material**

Cada grupo receberá:

- Suspensão de leveduras do gênero *Saccharomyces* spp. (meio ágar nutriente);
- Placas estéreis com ágar nutriente;
- Solução salina;
- *Swab* estéril (cotonete).

#### **Método**

##### **Transmissão direta:**

- Todos os alunos devem lavar as mãos com água e sabão;
- O primeiro aluno de cada grupo irá espalhar nas mãos uma pequena quantidade da suspensão de *Saccharomyces* spp. Em seguida, irá tocar a mão de um segundo aluno que irá tocar a mão de um terceiro aluno, até completar a cadeia de alunos de cada grupo.
- Cada aluno irá tocar com o dedo no quadrante de uma placa de ágar nutriente, previamente identificada de 1 a 4 e 5 a 8, correspondente à sua ordem no CICLO DE TRANSMISSÃO.

##### **Interrupção da Transmissão direta:**

- Todos os alunos devem lavar as mãos com água e sabão;
- O primeiro aluno de cada grupo irá espalhar nas mãos uma pequena quantidade da suspensão de *Saccharomyces* spp. Em seguida, irá tocar a mão de um segundo aluno que irá tocar a de um terceiro aluno;
- O terceiro aluno irá lavar as mãos com água e sabão antes de tocar a mão do quarto aluno, dando continuidade à cadeia até completar todo o grupo de alunos de cada grupo;
- Cada aluno irá tocar com o dedo no quadrante da placa de TSA, previamente identificada de 1 a 4 e 5 a 8, correspondente à sua ordem no ciclo de transmissão.

INCUBAR AS PLACAS A 37°C POR 24 HORAS.

**Transmissão Indireta:**

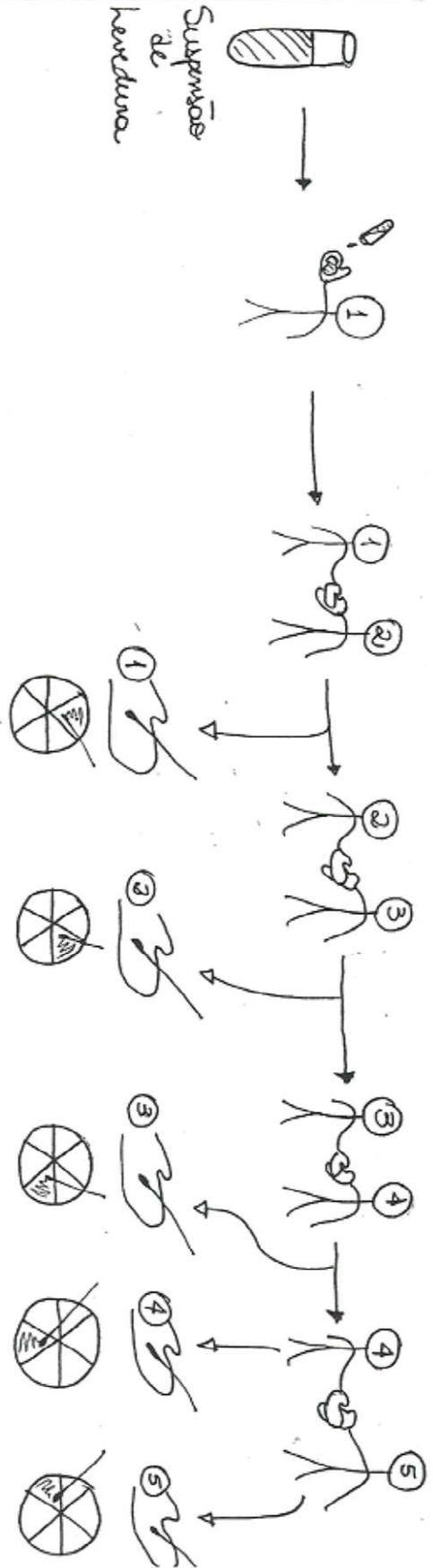
Um aluno de cada grupo irá umedecer o “swab” em solução salina estéril e encostará este na maçaneta da porta do laboratório para posteriormente inocular uma placa estéril de ágar nutriente para obter cultura pura por esgotamento.

**QUESTÕES PARA RELATÓRIO**

- 1. Qual é o efeito da lavagem das mãos na cadeia de transmissão de bactérias?**
- 2. Bactérias da microbiota humana poderiam produzir uma infecção em um animal? Cite um exemplo e comente se seria uma transmissão direta e indireta.**
- 3. Que tipo de microorganismos podem ser transmitido por aerossóis e que tipo de infecção poderiam produzir.**
- 4. Que medidas poderiam ser utilizadas para eliminar a possibilidade de transmissão de bactérias por superfícies inanimadas (macas, estetoscópios etc)?**

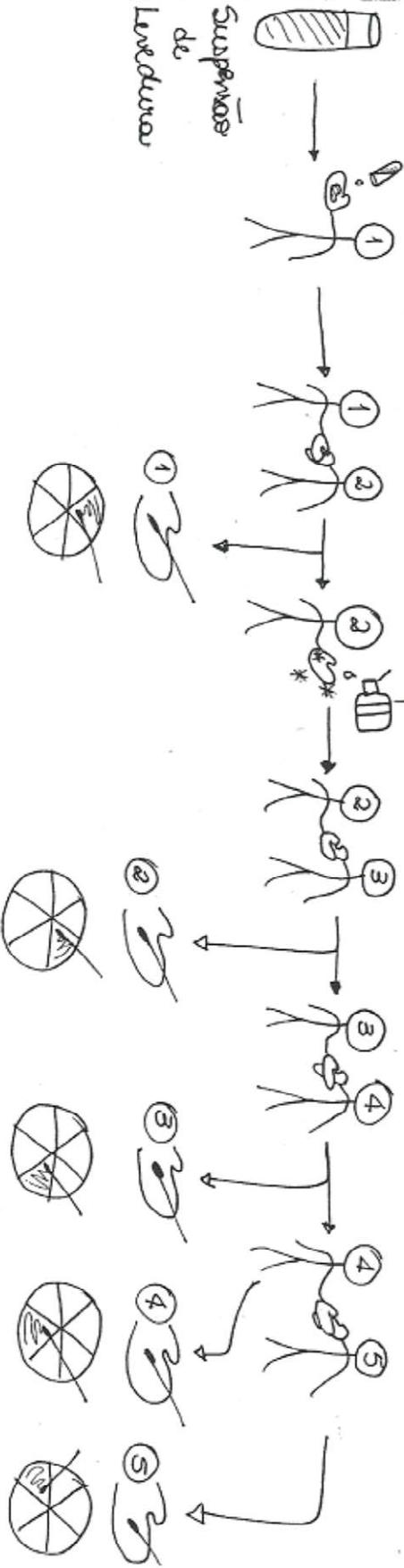
# Atividade A - Contaminação Direta

## A1. Experiência Controlada



**TODOS: LAVAR AS MÃOS ANTES E DEPOIS DAS EXPERIÊNCIAS!!**

## A2. Experiência Teste



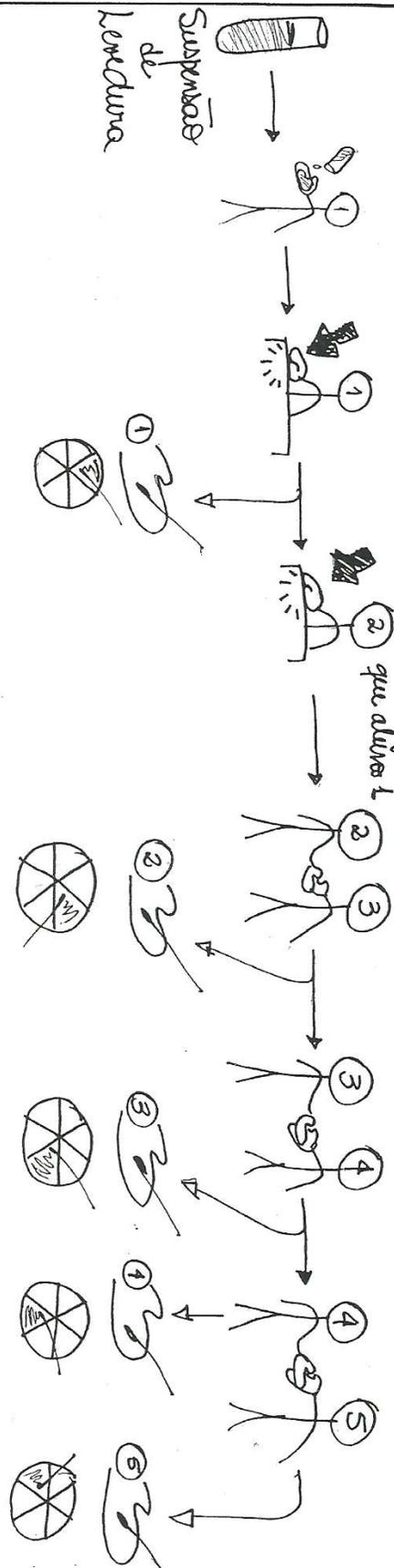
**TODOS: LAVAR AS MÃOS!!**

Gustavo Henrique

# Atividade B - Contaminações Indiretas

B1. Experiência Controlada

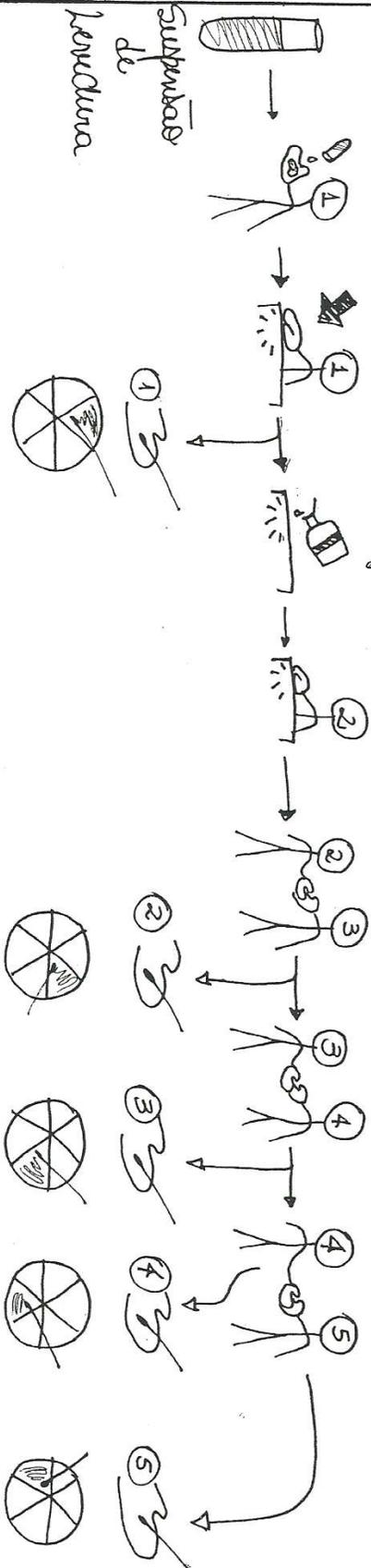
Aluno 2 coloca a mão no mesmo lugar que aluno 1



**TODOS: LAVAR AS MÃOS ANTES E DEPOIS DAS EXPERIÊNCIAS!!**

B2. Experiência Teste

Limpa a superfície com agente oxidante

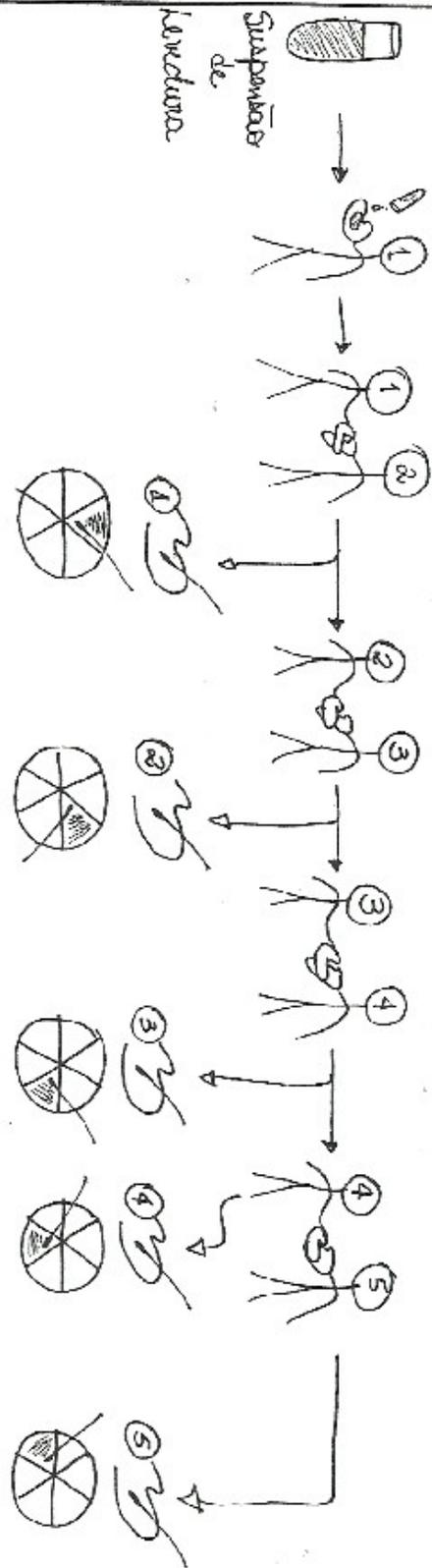


**TODOS: LAVAR AS MÃOS**

Cristiane Ferreira

# Atividade C - Contaminação direta com remoção mecânica pela água

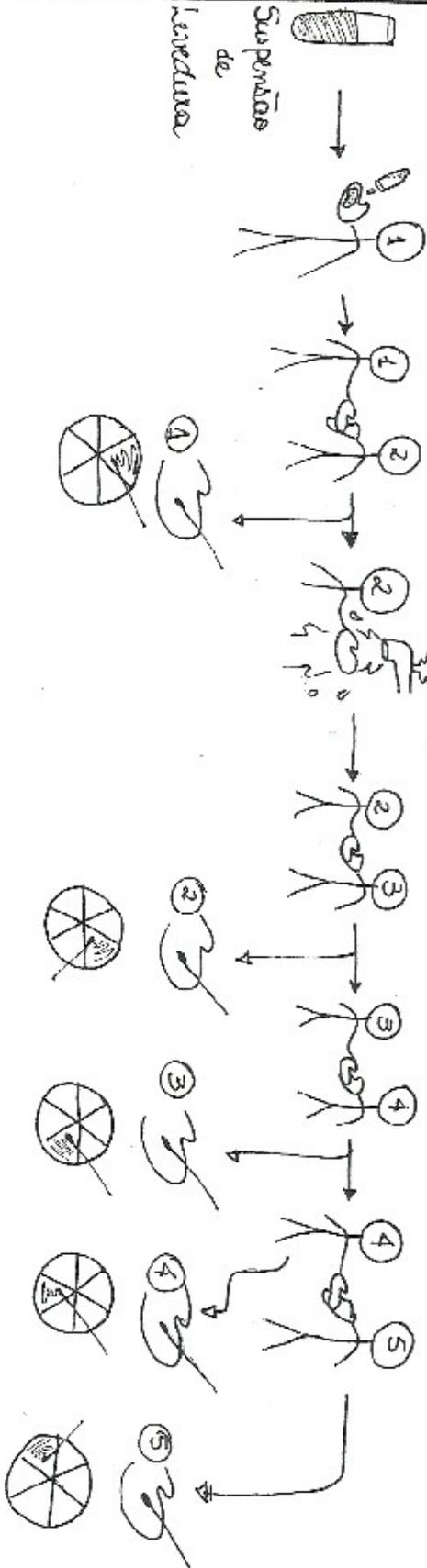
## C1. Experiência Controlada



**TODOS: LAVAR AS MÃOS ANTES E DEPOIS DAS EXPERIÊNCIAS!!**

## C2. Experiência Teste

Alinhe 2 laços a  
mão esquerda com água



**TODOS: LAVAR AS MÃOS!!**

## AULA PRÁTICA Nº 7

### BACIOS GRAM NEGATIVOS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA VETERINÁRIA (Enterobactérias)

**Ordem:** *Enterobacterales*

**Gêneros:** *Escherichia*

*Salmonella*

**Espécies:** *Escherichia coli*

*Salmonella typhi*

*Salmonella enteritidis*

As bactérias da família *Enterobacteriaceae* são **bastonetes (bacilos) Gram-negativos, fermentadoras de glicose**, anaeróbios facultativos, móveis ou imóveis. Quando móveis, são portadores de flagelos peritríqueos. São oxidases positivas e reduzem nitratos a nitritos. Alguns gêneros possuem cápsula como, por exemplo, *Klebsiella*.

Estas bactérias podem crescer em qualquer meio de cultura e para o isolamento seletivo se utiliza o meio de **MacConkey**, onde podem ser classificadas como **lactose positiva** ou **lactose negativa**. Para o gênero *Salmonella* existe o meio seletivo indicador SS (Ágar *Salmonella/Shigella*).

Enterobactérias podem ser isoladas de solo, água e alimentos contaminados. A maior parte são comensais do intestino do homem e outros animais.

A importância clínica deste grupo de bactérias é sua capacidade de produzir doenças entéricas (enteropatógenos). Espécies como *Salmonella* produzem febre entérica e gastroenterite, podendo evoluir para um quadro septicêmico (disseminação generalizada).

#### **Gênero *Escherichia***

Compreende cinco espécies, das quais *Escherichia coli* é a mais importante. Esta espécie pode ser móvel ou imóvel. Fermentam a glicose com produção de gás, não utilizam o citrato como fonte de carbono, são indol positivo e H<sub>2</sub>S negativo.

Existem diversas cepas de *Escherichia coli*. A maior parte constitui a microbiota intestinal do homem e outros animais e, ainda, a sua **presença em água e leite é um índice de contaminação fecal**. Porém, existem umas poucas cepas que são patogênicas produzindo diarreia (enteropatogênicas) ou infecção urinária (uropatogênica ou UPEC).

As cepas enteropatogênicas são classificadas com base no **mecanismo de patogenicidade e/ou estrutura antigênica** em:

1. *E. coli* enteropatógena clássica (EPEC)

2. *E. coli* enterotoxigênica (ETEC)
3. *E. coli* enteroinvasora (EIEC)
4. *E. coli* enterohemorrágica (EHEC)
5. *E. coli* enteroagregativa (EAEC).

Por exemplo, a *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) produz uma verotoxina que desencadeia a síndrome hemolítica urémica (SHU), que é a causa mais comum de falência renal em crianças.

A diferenciação dessas bactérias enteropatogênicas é realizada com provas bioquímicas (biotipagem) e testes sorológicos (sorotipagem), onde se detectam **antígenos somáticos [O de natureza lipopolissacarídea (LPS)], antígenos capsulares (K), e/ou antígenos flagelares (H)**.

Por exemplo para que uma *E. coli* seja considerada enteropatogênica clássica (EPEC), esta deve ser identificada como lactose positiva, móvel, indol positivo e sorotipo **O111** ou **O55**. Para que uma cepa de *E. coli* seja considerada como enterohemorrágica (**EHEC**), deve ser classificada como sorotipo **O157:H7**.

### **Gênero *Salmonella***

As *Salmonellas* são bacilos Gram negativos. A maior parte das espécies é móvel. São todas lactoses negativas e produzem gás de glicose (com exceção de *S. typhi*). Existem sorovariedades H<sub>2</sub>S positivas e citrato positivas. Uma das principais características é a tolerância destas espécies a altas concentrações de bile em comparação a outras enterobactérias, sendo esta propriedade explorada para fazer o isolamento seletivo dessas espécies nos meios seletivos SS, XLD e caldo selenito.

Assim como para *E. coli*, a diferenciação de cepas enteropatogênicas é realizada pela sorologia direcionada a classificar antígenos somáticos (O), antígenos flagelares (H), e antígenos de superfície Vi (similar a uma microcápsula que pode mascarar os antígenos somáticos).

As *Salmonellas* estão adaptadas ao trato gastrintestinal de um grande número de animais e do homem, considerando-se parasitas intracelulares facultativos pela sua capacidade de sobreviver e multiplicar-se intracelularmente:

- Sorotipos adaptados ao homem: *S. typhi*, *S. paratyphi A*
- Sorotipos adaptados a animais: *S. gallinarum*, *S. abortus*, *S. choleraesuis*
- Sorotipos sem hospedeiros específicos: *S. typhimurium*, *S. enteritidis* (principais agentes de diarreia).

**Atividade prática:**

**Objetivo:** realizar a identificação presuntiva de espécies da ordem Enterobacterales

**Material:**

1. Cada grupo receberá 2 culturas bacterianas crescidas em ágar nutriente.
2. Lâminas (1-2 unidades); bateria de corantes para a Coloração de Gram;
3. Placa de Ágar SS (*Salmonella/Shigella*) e placa contendo ágar McConkey
4. 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 SS e MacConkey

**(Próxima aula) Resultados/Interpretação:**

Diferencia colônias lactose positiva e lactose negativa.  
Observe a produção de H<sub>2</sub>S no meio SS.

**A) Meio sólido - Ágar MacConkey**

**Prova:** FERMENTAÇÃO DE LACTOSE:

- colônias Lactose positiva: coloração vermelha.
- colônias Lactose negativa: coloração transparente.

**B) Meio sólido - Ágar SS**

**Prova:** PRODUÇÃO DE H<sub>2</sub>S:

**QUESTÕES PARA RELATÓRIO**

1. Quais foram as bactérias identificadas pelo seu grupo?
2. Que meios seletivos são empregados para o estudo das Enterobactérias?
3. Quais são as doenças causadas pelas bactérias estudadas na aula prática?
4. Que prova bioquímica diferencia *Salmonella* spp. de *E. coli*?
5. O fato de isolar *E. coli* das fezes de um animal com enterite seria suficiente para fazer inferir que a cepa é enteropatogênica e responsável pelo quadro diarréico? Justifique.

## AULA PRÁTICA Nº 8

### COCOS GRAM-POSITIVOS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA VETERINÁRIA

Cocos gram-positivos constituem um grupo heterogêneo de bactérias amplamente distribuídas na natureza. Estas bactérias têm entre 0,8 a 1,0 µm de diâmetro e têm o potencial de causar doenças supurativas como mastite, infecções de pele e tecidos moles, infecções do trato respiratório superior, osteomielite, e infecções da ferida cirúrgica.

Taxonomicamente, podem ser divididos em:

1. Gênero *Staphylococcus*
2. Gênero *Streptococcus*
3. Gênero *Enterococcus* (previamente classificados como *Streptococcus* grupo D).

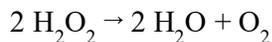
As bactérias do gênero *Staphylococcus*, usualmente se apresentam agrupadas em forma de cachos de uva (estafilococos). As espécies de maior importância médica são: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus epidermidis*. São bactérias piogênicas e causam, por exemplo: osteomielite, 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 seqüelas de algumas infecções anteriores.

As principais espécies do gênero *Enterococcus* são *E. faecalis* e *E. faecium*. Estes microrganismos são comensais do trato intestinal. As principais características são sua tolerância para crescerem em altas concentrações de sal (halófitos), em meios contendo bile e hidrolisar a esculina. Morfologicamente, são cocos Gram positivos que se observam isolados, aos pares ou formando cadeias curtas. A principal diferença com espécies do gênero *Streptococcus* é a que as bactérias do gênero *Enterococcus* não precisam de meios enriquecidos (ágar sangue) para crescer.

**Diferenciação bioquímica dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*:**

Para a diferenciação básica e confirmatória entre os gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus* 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:



Uma prova de catalase positiva pode ser facilmente verificada pela simples visualização de bolhas que são formadas quando se adiciona água oxigenada a uma suspensão bacteriana sobre uma lâmina de vidro.



\* EXCEPCIONALMENTE, espécies do gênero *Enterococcus* podem produzir uma **FALSA** reação **positiva** de catalase, pois estas espécies possuem uma DNA-peroxidase (não citocrômica) que, eventualmente, pode agir sobre o  $\text{H}_2\text{O}_2$  dando uma reação fraca, falsa positiva

### Gênero *Staphylococcus*

Uma vez definido o gênero bacteriano, para identificar espécies de *Staphylococcus*, utiliza-se a **prova da coagulase** para caracterizar *Staphylococcus aureus*, espécie de grande importância médica. Esta espécie coagula o plasma de coelho pela ação da enzima coagulase.



**Coagulase positive: *Staphylococcus aureus***

**Coagulase negative: *Staphylococcus* spp**

Outras provas bioquímicas equivalentes à prova da coagulase, no sentido que identificam *S. aureus* do resto das espécies de *Staphylococcus*, são a **prova de DNase** e a **utilização do manitol** (crescimento no **meio seletivo ágar manitol-sal** ou **ágar Chapman**).

O *Staphylococcus aureus* é DNase positivo e cresce em ágar manitol-sal, onde utiliza o manitol, modificando o pH pela fermentação do açúcar. Na prova da DNase é avaliada a hidrólise de DNA presente em um meio de cultura (ágar DNA). Se a bactéria depositada na superfície do ágar DNA hidrolisa o DNA do meio (pela produção da enzima DNase) após um período de incubação de 24 h (37 graus), produzirá um halo transparente ao redor da colônia crescida. Para facilitar a leitura do halo de hidrólise de DNA, é necessário adicionar um

volume de HCl 1 mM sobre a superfície do ágar DNA contendo a amostra bacteriana crescida.



DNase negativo (outras espécies de *Staphylococcus*)

DNase positivo (*Staphylococcus aureus*)

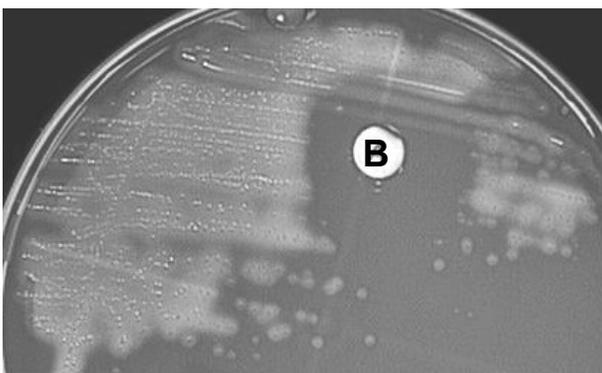
### Gênero *Streptococcus*

Cocos Gram positivos catalase negativos do gênero *Streptococcus*, são identificados segundo a capacidade de colônias isoladas de **hemolisar hemácias de carneiro** presentes em meio sólido Ágar Sangue.

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.

No que diz respeito às bactérias do gênero *Streptococcus*, estas bactérias podem produzir halos claros em volta da colônia (halo de hemólise). Quando o halo é totalmente claro, diz-se que a hemólise é do tipo **beta ( $\beta$ -destruição total das hemácias)**; quando esverdeado, diz-se hemólise é do tipo **alfa ( $\alpha$  - destruição parcial das hemácias)** e quando não há hemólise, esta é chamada do tipo **gama ( $\gamma$  - ausência de hemólise)**.

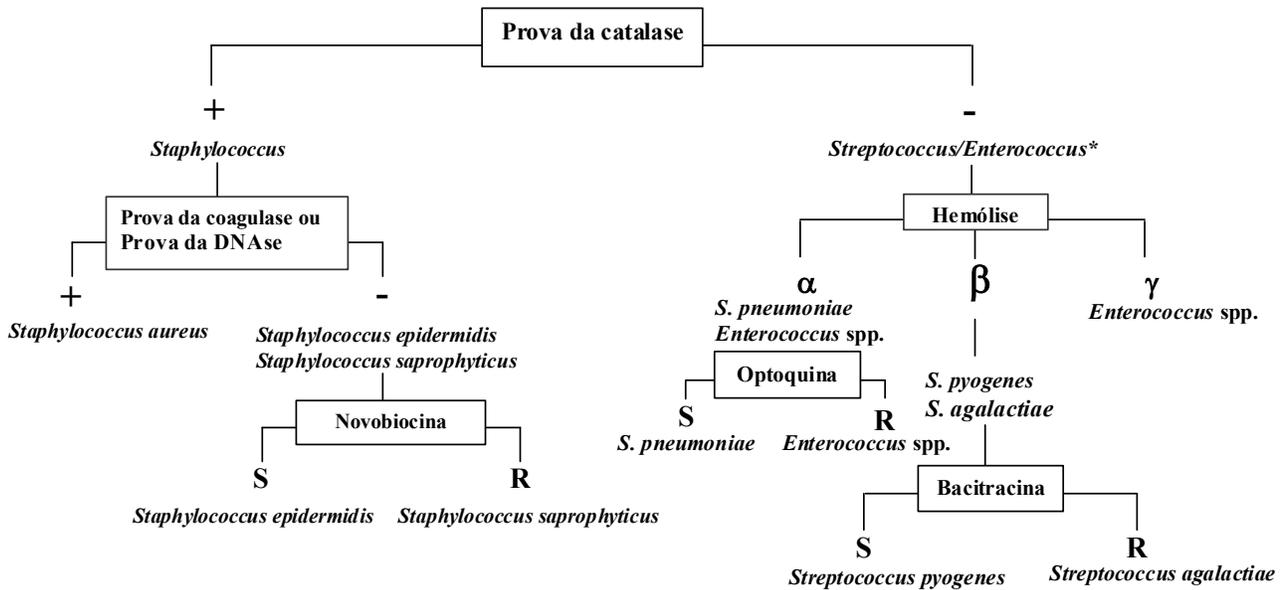
Em se tratando de uma bactéria **beta-hemolítica**, utiliza-se a **prova da bacitracina** que caracteriza *Streptococcus pyogenes*, (*Streptococcus* beta-hemolíticos do grupo A (sorogrupo A)). Um disco de papel filtro contendo 0,05 unidades de bacitracina é depositado na superfície de uma placa com Ágar 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.



*Streptococcus pyogenes* (Beta-hemolítico) exibindo **sensibilidade à BACITRACINA**

No caso de bactérias do gênero *Streptococcus* que apresentam **alfa-hemólise**, utiliza-se de maneira semelhante a **prova da optoquina** (cloreto de etil-hidrocupreina). Se o estreptococo em estudo for o *Streptococcus pneumoniae* (pneumococo) formará uma zona de inibição de crescimento de 15 a 30 mm que não aparece no caso de outras espécies de *Streptococcus*.

### Esquema simplificado para identificação de Cocos Gram-positivos



\* *Enterococcus* pode apresentar um falso resultado positivo para a prova da catalase

### Atividade experimental

#### Material:

1. Cada grupo receberá 2 placas de Ágar Sangue contendo:
  - a) placa 1: 2 cepas de *Staphylococcus* spp
  - b) placa 2: 2 cepas de *Streptococcus* spp.
2. Lâminas de vidro e bateria de corantes para a coloração de Gram;
3. Conta gotas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 unidade);
5. 1 placa com meio seletivo Ágar manitol-sal (Ágar Chapman);

**Procedimento:**

1. Realizar coloração de Gram de todos os isolados das placas 1 e 2. Anotar os resultados;

2. Realizar a **Prova da catalase** de todas as culturas das placas 1 e 2:

Em cada lâminas de vidro fazer uma suspensão bacteriana de cada isolado por separado (n = 4) com solução fisiológica estéril. Para cada suspensão bacteriana, adicionar 2-3 gotas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 Volumes. Agitar levemente e observar se ocorre o aparecimento de bolhas efervescentes. Identificar as culturas:

- Presença de bolhas = **catalase positivas** → *Staphylococcus* spp.

- Ausência de bolhas = **catalase negativas** → *Streptococcus* spp.

2. Semear as culturas das placa 1 e 2 em meio sólido Ágar-manitol-sal. Incubar as placas a 37° C, em estufa, por 16-24 horas.

**Com as culturas da placa 2:**

*Streptococcus* spp.:

A) Realizar a prova da **análise do tipo de hemólise** com todas as culturas de *Streptococcus*. Anotar cada resultado.

i) β-hemólise (hemólise total)

ii) α-hemólise (hemólise parcial)

iii) γ-hemólise (ausência de hemólise)

**A LEITURA E INTERPRETAÇÃO DO CRESCIMENTO EM ÁGAR CHAPMAN (MANITOL-SAL) SERÁ REALIZADAS NA PRÓXIMA AULA.**

**Continuação da aula prática (Leitura e Interpretação dos resultados)**

- Observar o crescimento das culturas crescidas em meio sólido Ágar-manitol: colônias de cor amarela = fermentação positiva de manitol → *Staphylococcus aureus*.

**QUESTÕES PARA RELATÓRIO**

**1. Os cocos Gram-negativos freqüentemente estão presentes em infecções purulentas. A coloração de Gram é suficiente para diferenciar as bactérias dos gêneros *Staphylococcus* das bactérias do gênero *Streptococcus*?**

**2. Quais são as principais espécies do gênero *Staphylococcus* causadoras de mastite bovina? Como pode ser identificada no laboratório?**

**3. Qual é utilidade do meio manitol-sal (ou ágar Chapman)**

# Módulo I - Micologia

## AULA PRÁTICA Nº 9

### A) MORFOLOGIA DE FUNGOS

#### INTRODUÇÃO

A identificação dos fungos é baseada quase que exclusivamente em sua morfologia tanto macro como microscopicamente. 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.

A unidade estrutural dos fungos é representada pela hifa e o conjunto desses elementos é denominado micélio. O micélio pode ser diferenciado em vegetativo, quando exerce as funções de assimilação de alimentos e fixação em substratos e de frutificação que serve à reprodução dos fungos. O micélio vegetativo também pode se reproduzir.

#### *Micélio vegetativo*

De acordo com a morfologia, apresenta 3 tipos:

Unicelular: Células arredondadas, ovóides ou alongadas, podendo se reproduzir por brotamento, cissiparidade ou por outro processo. 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. Esses esporos são denominados conídios e caracterizam a Subdivisão Deuteromycotina.. Ex. *Aspergillus*, *Penicillium*.

Endósporos: esporos produzidos no interior de esporângios. Os esporos, nesse caso são chamados de esporangiósporos e caracterizam a subdivisão Zygomycotina. Ex. *Rhizopus*, *Mucor*, *Absidia*.

#### **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*.

### **MORFOLOGIA MACROSCÓPICA**

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

### **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>

## **B) COLÔNIA GIGANTE E MICROCULTIVO**

### **COLÔNIA GIGANTE DE BOLORES E LEVEDURAS**

Com o auxílio de alça de platina, retirar um pequeno fragmento da colônia e cultivar um único ponto no centro da placa de Petri contendo ágar Sabouraud.

#### **MICROCULTIVO DE BOLORES.**

Utilizar placas de Petri contendo lâminas dispostas (lâmina de suporte e lâmina de cultivo) contendo um pequeno quadrado (1 cm) de ágar batata, sobre a lâmina. Com alça de platina, retire um pequeno fragmento de uma colônia escolhida e semeie todos os lados do ágar. Coloque uma lamínula estéril sobre o ágar e, sobre o papel de filtro, coloque água destilada estéril para evitar dessecação do meio. Feche a placa e deixe à 25°C ambiente durante 7 dias. Coloque numa lâmina, uma gota de lactofenol azul algodão e a lamínula com o fungo impregnado em cima. Examinar ao microscópico e tentar identificar. Faça desenho.

#### **MICROCULTIVO DE LEVEDURAS**

Utilizar placas de Petri contendo lâminas dispostas (lâmina de suporte e lâmina de cultivo). Com todo cuidado de assepsia, retire um pequeno fragmento da colônia de levedura e semeie em estria (2 estrias) sobre meio de cornmeal ágar + Tween 80 sobre a lâmina. Coloque uma lamínula estéril sobre o ágar e, sobre o papel de filtro, coloque água destilada estéril para evitar dessecação do meio. Feche a placa e deixe à 25°C ambiente durante 2 dias. Examine ao microscópico e observe se há formação de clamidoconídio. Faça desenho:

<b>Fungos</b>	<b>Grupos</b>
<i>Aspergillus</i> sp.	1-5-9-11-15-19
<i>Penicillium</i> sp.	2-6-12-16
<i>Rhizopus</i> sp	3-7-10-13-17-20
<i>Candida</i> sp.	4-8-18-18

## C) ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS DO 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 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 agar batata para isolamento de fungos de solo

Placas de Petri com agar batata para isolamento de fungos de materiais diversos

Placas de Petri com terra para isolamento de dermatófitos - todos os grupos

### **ISOLAMENTO DE FUNGOS ANEMÓFILOS**

#### **- Todos os grupos**

Expor placas de Petri, contendo agar 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**

#### **- Grupos: 1-6-11-16: abastecimento público**

#### **- Grupos: 3-8-13-18: água do lago**

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. No caso dos grupos que trabalharam com água do lago, estes receberam um tubo contendo o material. Semear 0,1 ml do líquido em agar Sabouraud. Espalhar com alça de Drygalsky e cultivar à temperatura ambiente. Após 4 dias realizar a contagem de colônias crescidas e iniciar a identificação das mesmas.*

## **ISOLAMENTO DE FUNGOS DE SUBSTRATOS ALIMENTARES**

### **- Grupos: 4-9-14-19**

Fazer uma suspensão do substrato em água destilada estéril (g/ml): 1 grama do alimento + 9 mL de água destilada estéril. Semear em em agar batata acidificado. Semear 0,1 ml e espalhar com alça de Drygalsky.

## **ISOLAMENTO DE FUNGOS DE SOLO**

### **- Grupos: 2-7-12-17**

Fazer uma suspensão do substrato em água destilada estéril (g/ml): 1 grama do alimento + 9 mL de água destilada estéril. Semear em em agar batata acidificado. Semear 0,1 ml e espalhar com alça de Drygalsky.

## **ISOLAMENTO DE FUNGOS DE MATERIAIS DIVERSOS**

### **- Grupos: 5-10-15-20**

Escolher uma superfície (celular, dinheiro, caneta). Umedecer o swab no tudo contendo água destilada estéril, friccionar sobre a superfície. Espalhar com o swab na superfície da placa de Petri contendo ágar batata.

## **ISOLAMENTO DE DERMATÓFITOS DO SOLO (Método de Vanbreuseghen)**

### **- Todos os grupos**

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.

Os grupos receberam 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.

## AULA PRÁTICA Nº 10

### **ISOLAMENTO DE FUNGOS EM GRÃOS POR SEMEADURA DIRETA.**

*Finalidade:* Proceder o isolamento e a contagem de fungos em grãos, expressa pela frequência de isolamento.

*Material* – Grãos de milho e solução de hipoclorito de sódio 0,4%

#### *Procedimento*

Amostras de grãos de milho serão imersas em solução de hipoclorito de sódio 0,4 % por 2 minutos. Um mínimo de 30 grãos deverão ser desinfectados por 3 minutos. Os grãos deverão ser enxaguados, por três vezes, com água destilada esterilizada. Com auxílio de uma pinça, plaquear 5 grãos em cada placa de Petri contendo agar. Os grãos não devem estar muito próximos uns dos outros, para não dificultar a posterior leitura das placas. As placas serão incubadas, sem inverter, a 25 °C por 5 dias e os resultados serão expressos como percentagem do total de grãos inoculados infectados por fungos.

#### **Demonstração:**

Muitas micotoxinas são fluorescentes ou produzem subprodutos fluorescentes que podem ser detectados com luz ultravioleta. A técnica de cromatografia em camada delgada (CCD), em folha, utilizando como fase móvel uma solução de clorofórmio/acetona (9:1) auxilia na identificação de AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>. Trata-se de um método acessível e simples, mas limitado pois o limite de detecção é mais baixo do que outras técnicas como cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa.

## AULA PRÁTICA Nº 11

### IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS PRODUTORES DE MICOSES SUPERFICIAIS E CUTÂNEAS: *Malassezia furfur* E DERMATÓFITOS

#### INTRODUÇÃO

##### **Pitiríasis versicolor**

**Definição:** dermatose superficial crônica, cosmopolita, muito freqüente em clima tropical, caracterizada pelo aparecimento de pequenas manchas bem delimitadas, de coloração variável, localizadas principalmente no tronco e no abdômen. Atinge indistintamente todas as raças e mais freqüentemente adultos jovens.

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

**Características clínicas:** Lesões superficiais, atingindo principalmente o tronco e abdômen, mas podendo acometer pescoço, face, braços, e raramente mão e região inguinocrural. As lesões se apresentam sob a forma de manchas hipocrômicas descamativas irregulares, de cor variável, dependendo da cor do indivíduo, e condição do clima. Apresenta fluorescência à luz de Wood.

**Diagnóstico micológico:** as escamas devem ser clarificadas pela potassa a 20% ou 30%. Ao exame microscópico observam-se células birrefringentes arredondadas, isoladas ou agrupadas com um cacho de uvas ao lado de hifas curtas, septadas, ramificadas.

##### **Dermatofitoses**

###### **Definição:**

É uma infecção cutânea, com uma variedade de aspectos clínicos, cujos agentes etiológicos atacam com predileção a queratina da pele, pelos e unhas. A infecção é geralmente restrita às camadas não vivas da superfície corpórea. A maioria destas infecções são causadas por um grupo homogêneo de fungos queratinofílicos chamados dermatófitos.

Os dermatófitos são divididos em gêneros, segundo:

Forma assexuada de reprodução:

- *Microsporum* spp.
- *Trichophyton* spp.
- *Epidermophyton* spp.

Forma sexuada da reprodução:

- *Arthroderma* spp.

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*.

Para a coleta do material biológico devemos utilizar: Placa de Petri; tesoura; bisturi; pinça e lâminas de microscopia.

Das lesões do couro cabeludo devemos coletar, com pinça os fios de cabelo que já estão tonsurados na periferia da lesão.

Nas lesões circinadas devemos raspar, com bisturi ou com a própria lâmina, na bordas das lesões, pois é o local onde o fungo está em atividade.

Nas oníquias sub-ungueais deve-se raspar por debaixo da unha, em contato com o tecido são. A unha pode ser cortada.

Todo material deve ser coletado em placa de Petri ou entre duas lâminas. Não se deve misturar materiais de locais diferentes.

**Exame direto:** Submeter o material ao amolecimento e a clarificação com potassa (KOH) diluição a 10, 20 ou 30% a quente.

### **O que procurar nas preparações:**

Exame direto de escamas de pele ou unha apresentam filamentos micelianos longos, ramificados, septados, algumas vezes com arthroconídeos.

Exame direto de cabelo ou pêlo: bainha de esporos redondos ao redor do pêlo (parasitismo ectothrix) ou filamentos com arthroconídeos no interior do pêlo (parasitismo endothrix). Pode ocorrer parasitismo endo e ectothrix ao mesmo tempo.

**Cultura:** todos os dermatófitos crescem facilmente no meio de ágar Sabouraud dextrose ou no meio "Mycosel" (meio de Sabouraud acrescido de cloranfenicol, inibidor bacteriano, e de cicloheximida, que inibe fungos filamentosos contaminantes).

## **2.1. Isolamento de dermatófitos do solo - Método de Vanbreuseghen ou Técnica da Isca - leitura**

Esta técnica permite o estudo da ocorrência de dermatófitos em determinada região. Os dermatófitos têm a capacidade de crescer em queratina e, devido a este fato, utilizamos pêlos ou outro material que a contenha, como isca para "pescar" o dermatófito – essa técnica foi apresentada na primeira aula do módulo de Micologia e devido ao crescimento lento o material será analisado na última aula prática do módulo.

## **2.2. Observação de material clínico: raspado de pele positiva para dermatófito**

### 2.3. Observação de lâminas focalizadas, pranchas e culturas de:

<i>Micoses Cutâneas</i>	
<i>Otite externa</i>	<i>Malassezia sp.</i>
<i>Dermatofitoses</i>	
<i>Achado em pêlo</i>	<i>Agente etiológico</i>
Microsporia	<i>Microsporum canis</i>
	<i>Microsporum gypseum</i>
Tricoficea	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
	<i>Trichophyton rubrum</i>
Pele positiva para dermatófitos	

### 2.4. Demonstração de prova bioquímica – UREASE para dermatófitos

*T. mentagrophytes* – urease (+)

*T. rubrum* – urease (-)

## AULA PRÁTICA Nº 12

### **Identificação de fungos com dimorfismo térmico: *Sporothrix schenckii*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum***

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 2-3 $\mu$  x 3 $\mu$ , 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.

## AULA PRÁTICA Nº 13

### **IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS DE INTERESSE MÉDICO: *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* (Provas bioquímicas e Morfológicas)** **INTRODUÇÃO**

#### **Candidíase**

##### **Definição**

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*, *tropicalis*, *pseudotropicalis*, *krusei*, *guilliermondii*, *stellatoidea* e *parapsilosis*. 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. Desde que a *C. albicans* é uma levedura endógena, isto é, encontrada normalmente no homem, sua manifestação representa um processo oportunístico.

Para que *C. albicans* 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.

Freqüentemente, o paciente apresenta debilitação em seus mecanismos de defesa ou tem uma doença de base.

Nos pacientes idosos debilitados, recém-nascidos prematuros e nos desnutridos, a ocorrência de candidose 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 candidose vaginal. Tratamentos prolongados com antibióticos, principalmente os chamados de largo espectro de ação, corticóides, drogas antitumorais e os anticoncepcionais favorecem a instalação de candidose.

Um dos principais fatores locais para a instalação de candidose 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.

O mecanismo exato de penetração de *C. albicans* na pele e mucosa ainda não está elucidado. Alguns pesquisadores defendem que ela ocorra através de blastoconídios, enquanto que a maioria sugere que a penetração se efetue através do pseudomicélio, que teria maior virulência.

#### **Diagnóstico micológico**

**Material biológico:** raspados das lesões cutâneas e das mucosas, expectoração, raspados das unhas, urina, sangue e biópsias, entre outros.

##### **Exame direto:**

- a fresco com KOH a 20%
- esfregaços corados pelo Gram ou Giemsa (além de poder visualizar os elementos fúngicos, permite avaliar a quantidade de microrganismos)
- cortes histológicos: PAS ou Gomori & Grocott (elementos leveduriformes com brotamentos e filamentos abundantes).

**Cultura:** em meio ágar Sabouraud dextrose + cloranfenicol; após 24-48 horas colônias cremosas, esbranquiçadas, brilhantes. Ao exame microscópico visualiza-se apenas os elementos leveduriformes comuns a todas as espécies de *Candida*.

### **Identificação da espécie de *C. albicans***

1. Produção de clamidoconídios: em meio de fubá (“corn meal ágar”+ tween 80), a *C. albicans* produz clamidoconídios terminais ou intercalares, redondos ou ovais, após 24-48 h.
2. Produção de tubo germinativo: a *C. albicans* produz o tubo germinativo em presença de soro (humano, fetal bovino) após 1-3 horas à 37° C.
3. Assimilação de fontes de carbono e nitrogênio – Auxanograma.
4. Fermentação de açúcares – Zimograma.

## **Criptococose**

### **Definição**

É uma infecção subaguda ou crônica de comprometimento pulmonar, sistêmico e, principalmente, do sistema nervoso central, causada pelo ***Cryptococcus neoformans***. 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, ocasionado meningite criptocócica.

***C. neoformans*** é essencialmente o único agente etiológico da criptococose, doença do homem e de animais, tais como: gatos, cães e cavalos. A espécie ***C. neoformans*** caracteriza-se também por provocar morte rápida (3 a 4 dias) de camundongos inoculados através de via cerebral, formando extensas massas tumorais.

***C. neoformans*** é de distribuição cosmopolita e está associado com habitat de aves. O pombo parece ser o principal vetor para a distribuição e manutenção do fungo. Não parece que o pombo tenha a infecção, uma vez que ele tem uma temperatura corporal em torno de 42°C. O fungo vive nas fezes 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.

### **Diagnóstico micológico**

**Materiais biológicos:** líquor, escarro, pus ganglionar, exsudatos de lesões cutâneas e mucosas, urina e sangue.

**Exame direto:** a fresco com tinta nanquim (*C. neoformans* é visualizado como uma célula redonda, circundada por uma cápsula não corada)

**Cultura:** o material deve ser semeado em ágar Sabouraud dextrose e dará crescimento a uma colônia viscosa, lisa, brilhante. Com o tempo, a colônia escorre para a base do tubo.

#### **3.1. Auxanograma**

Preparar uma suspensão de *C. albicans*. Assinalar no fundo da placa, os açúcares a serem empregados. Fundir em banho-maria, o meio de cultivo (meio C e meio N). Esfriar até 40-45 °C. Semear a suspensão da levedura pela técnica “pour plate”. Após solidificação, colocar os açúcares (pequenas alíquotas) com uma espátula estéril. Incubar a 25° C e realizar a leitura após 48 horas.

### **3.2. Zimograma (demonstração)**

Semear um **pequeno inóculo** com a alça em “L” da cultura de *Candida* nos tubos contendo solução de açúcares a 2%. Agitar levemente os tubos, incubar a 25° C durante 5 a 14 dias. Observar a presença ou não de formação de CO<sub>2</sub> através de bolha retida nos tubos de Durhan.

### **3.3. Microcultivo de leveduras:**

Utilizar placas de Petri contendo lâminas dispostas sobre um bastão de vidro. Com todo cuidado e assepsia, coloque 1 ml de corn meal 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)

### **3.4. Urease**

Para diferenciação de *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*. Semear as leveduras no meio de uréia com indicador de pH (fenol vermelho). Incubar em estufa. Verificar a mudança do pH até 20 dias. Urease+ (vermelho) urease- (amarelo).

### **3.5. Material clínico - Líquor**

- Suspensão de líquido
- Tinta nanquim
- Alça fechada
- Tubos com água estéril para esfriar a alça
- Lâmina
- Lamínula

### **3.6. Material clínico – Mucosa oral**

- Suspensão de mucosa oral
- Alça fechada
- Tubos com água estéril para esfriar a alça
- Lâmina
- Lamínula

### **3.7. Observação de lâminas e pranchas**

Tubo germinativo

Histopatológico de candidíase

Histopatológico de criptococose

Roteiro para elaboração do Relatório:  
**Prática 3- Candidose e Criptococose**

- a) Descreva os principais aspectos micromorfológicos de *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* em vida parasitária (secreção, liquor e tecido);
- b) Descreva os principais aspectos morfológicos (macro e microscópicos) das culturas de *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*;
- c) Provas bioquímicas utilizadas para caracterização dos agentes etiológicos (Auxanograma, Zimograma e Urease): Finalidade e Resultados obtidos pelo seu grupo.

## **Aula 14**

Leitura das práticas anteriores

- 1- Observação do micro e macro-cultivo de bolores e leveduras – visualizar estruturas microscópicas
- 2- Análise da frequência e diversidade de fungos dos estudos ecológicos.
- 3- Verificar a presença de dermatófitos nas amostras de solo e visualizar suas estruturas microscópicas.
- 4- Identificar concentração mínima inibitória para crescimento fúngico do antifungigrama, e efeito do alho e cravo como agentes inibidores de crescimento.
- 5- Verificar presença de fungos das amostras de grão de milho (prática aula 15)

# Módulo III: Virologia

## AULA PRÁTICA Nº 15

### CULTIVO DE VÍRUS E EFEITOS CITOPÁTICOS

#### INTRODUÇÃO

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios, portanto, precisam infectar células vivas para sua multiplicação.

Os sistemas celulares mais utilizados para o isolamento dos vírus são: as culturas de células *in vitro*, os ovos embrionados de galinha e os animais de laboratório. A grande variedade de sistemas e métodos utilizados para o isolamento dos vírus, de fato, reflete que as condições ótimas de isolamento são peculiares para cada vírus. Se um determinado vírus for inoculado em um hospedeiro não suscetível, muito provavelmente, o isolamento tenderá a fracassar e haverá possibilidade de se obter um resultado falso negativo.

As culturas celulares apresentam grande variação na sua suscetibilidade aos diferentes vírus. Por exemplo, para o isolamento de poliovírus, as culturas mais indicadas são as culturas primárias ou as linhagens celulares de rim de macaco (GMK - rim de macaco verde ou LLC-MK2 - rim de *Macaca mulata*); os adenovírus são isolados apenas em linhagens celulares humanas como a HEp-2 (carcinoma epitelial humano) e a HEK-293 (rim de embrião humano); o vírus do sarampo e os herpesvírus são cultivados em células VERO (rim de macaco verde).

Os vírus, quando inoculados em culturas celulares, iniciam a sua multiplicação logo após a penetração na célula. Esta multiplicação viral irá provocar uma série de alterações fisiológicas e morfológicas na célula infectada, que podem ser visualizadas por microscopia óptica. As alterações morfológicas que ocorrem nas células em cultura quando infectadas por vírus são denominadas de **efeito citopático**.

A infectividade de um vírus depende de vários fatores, entre eles, da proporção de partículas virais completas ou infecciosas; da suscetibilidade da célula hospedeira (ex. quantidade de receptor) e da chance desta partícula encontrar o receptor e penetrar na célula.

Quando células suscetíveis são misturadas com uma suspensão de vírus, estas podem receber uma, duas, três, dez partículas virais ou nenhuma. Isto tudo depende da proporção entre a quantidade de vírus infecciosos presente no inóculo e a quantidade de células utilizadas. Esta relação é denominada de **multiplicidade de infecção** ou **MOI**. Uma MOI indica que a infecção foi feita, a principio, com 1 vírus ou 1 dose infectante por célula. A proporção de vírus infecciosos e o número de partículas virais presentes em 1 MOI difere

entre os vírus. Para o poliovírus esta proporção é de 1 vírus infectivo em 30 partículas virais; já para o vírus da influenza, 1 em 50; herpesvírus, 1 em 200 e para o papilomavírus 1 em 10.000.

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. As alterações patológicas mais detalhadas podem ser estudadas através da infecção de células em monocamada, cultivadas sobre lamínulas. As culturas de células confluentes são infectadas com vírus, incubadas a 37°C e observadas diariamente. Após o aparecimento do efeito citopático, as lamínulas são fixadas e coradas através de métodos citológicos de coloração, como por exemplo, o método da hematoxilina-eosina. Em seguida, são montadas em lâminas de microscópio.

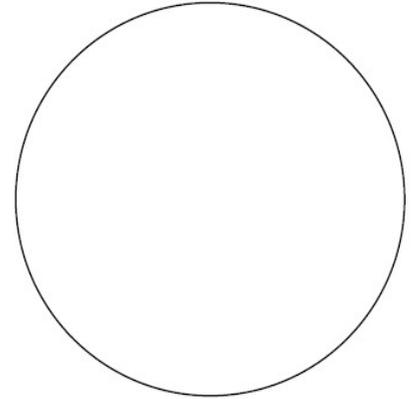
Durante a multiplicação viral ocorrem a síntese de proteínas e a replicação do ácido nucléico viral. Os componentes virais são agrupados para a montagem das novas partículas virais. Por fim, os novos vírus são liberados das células.

Os vírus multiplicam-se no núcleo ou no citoplasma das células, onde se agrupam formando massas chamadas "**corpúsculos de inclusão**". A presença de corpúsculos de inclusão indica multiplicação viral. Assim, em cortes histológicos de tecidos infectados por vírus podemos encontrar células com corpúsculos de inclusão que, pelas suas características e pela sua localização, permitem a identificação do vírus que os produz e, portanto, auxiliam no diagnóstico da doença.

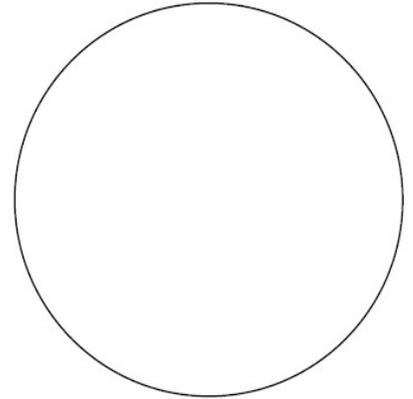
### **Exercício Prático: Efeito Citopático**

**Objetivo:** observar ao microscópio as lâminas apresentadas e fazer um esquema dos efeitos citopáticos observados. Identificar claramente todas as estruturas.

- a) Cultura de células do tipo epitelial normais, não inoculadas, formando camada monocelular contínua (monocamada). Apresentam o citoplasma corado em rosa (eosina) e o núcleo em roxo (hematoxilina), com um, dois ou três nucléolos bem evidentes.

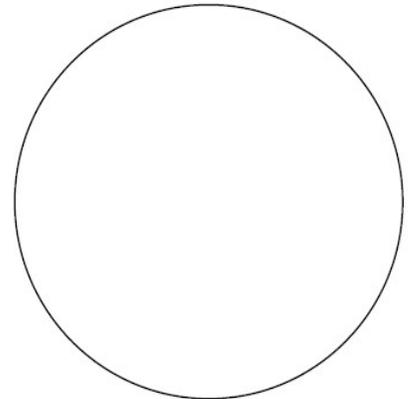


- b) Efeito citopático produzido por **poliovírus** e outros picornavírus: as células apresentam-se pequenas, com formas irregulares, isoladas ou em grupos, com o citoplasma eosinófilo e núcleo picnótico e reduzido em volume. Os poliovírus causam lise celular.

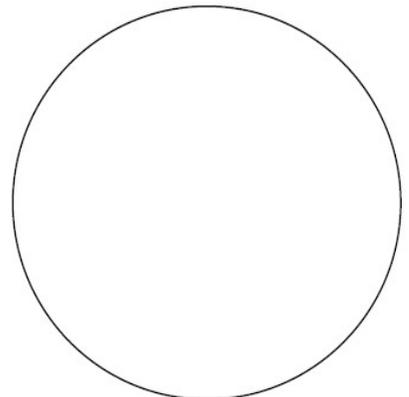


- c) Efeito citopático produzido por **adenovírus**: as células infectadas apresentam-se grandes, arredondadas e, às vezes, reunidas em "cachos", com alterações nucleares evidentes e características, como núcleo "em flor", ou dividido em lojas, indicativo de apoptose.

**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, com formação de sincícios. Os núcleos



apresentam sua estrutura conservada, com nucléolos visíveis.

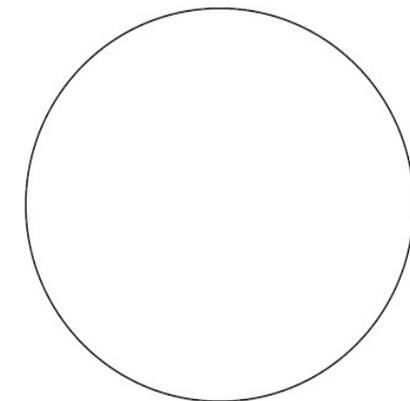
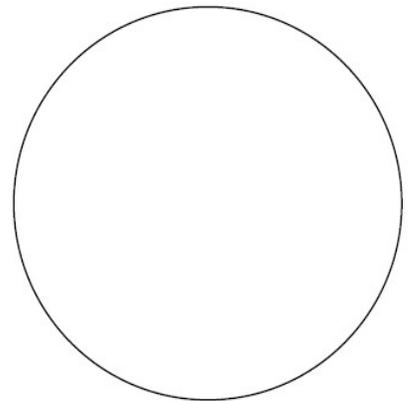
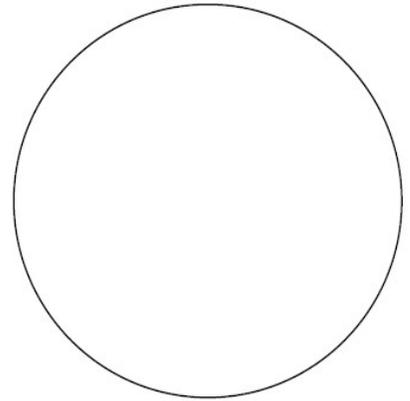
**Corpúsculos de inclusão:** eosinófilos, nucleares ou citoplasmáticos.

- 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. Observar as "pontes citoplasmáticas" intercelulares, que conferem a algumas células uma forma estrelada.

**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. Os núcleos apresentam sua estrutura conservada, com nucléolos visíveis. **Corpúsculos de inclusão:** eosinófilos e citoplasmáticos (corpúsculos de inclusão de Guarnieri)

- g) O **citomegalovírus** é um vírus de DNA pertencente ao grupo dos Herpesvírus. O material da lâmina é corte histológico de glândula salivar, corado pelo método da hematoxilina/eosina. As células encontram-se 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 roxo e circundado por um halo claro.



## QUESTÕES PARA RELATÓRIO

1- Defina efeito citopático

2- Preencher a tabela abaixo:

VÍRUS	FAMILIA	Estrutura do capsídeo (simetria)	Presença / ausência de envoltório	Ácido nucléico (classe)	Formação de sincício	Local da multiplicação na célula
<b>Poliovírus</b>	Picornaviridae					
<b>Adenovírus</b>	Adenoviridae					
<b>Vírus do sarampo</b>	Paramyxoviridae					
<b>Herpes simplex</b>	Herpesviridae					
<b>Vírus da vaccínia</b>	Poxviridae					
<b>Citomegalovírus</b>	Herpesviridae					

2- Por que os corpúsculos de inclusão do Adenovírus e do vírus Herpes são nucleares, enquanto os do vírus Vaccínia são citoplasmáticos?

3- Que tipo de estrutura viral está relacionada à formação de sincício? Por que?

## AULA PRÁTICA Nº 16

### REAÇÕES DE HEMAGLUTINAÇÃO E INIBIÇÃO DA 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 oroconversoão.

### **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:**

- 0,5 ml de suspensão de vírus Influenza (líquido alantóico de ovo embrionado de galinha);
- 10 ml de solução fisiológica;
- 3 ml de suspensão de hemácias de galinha a 1%;
- 3 pipetas conta-gotas;
- placa escavada para microtitulação;
- 9 tubos de ensaio 12 x 75mm.

#### **Técnica:**

1. Com pipeta conta-gotas, distribuir 0,5 ml de solução fisiológica em cada um dos tubos, inclusive no tubo identificado como Influenza (que já contém 0,5 ml de vírus não diluído);
2. Homogeneizar a suspensão do vírus Influenza (diluição 1/2) e transferir 0,5 ml para o 2º tubo da série. Homogeneizar e transferir 0,5 ml para o 3º tubo e assim sucessivamente, até o último tubo (diluição 1/1024);
3. Com a mesma pipeta conta-gotas, começando pela maior diluição (1/1024), transferir 1 gota (0,025 ml) de cada diluição viral para um orifício da placa, de acordo com a marcação desta;
4. Para o controle de hemácias, com uma pipeta conta-gotas limpa, adicionar solução fisiológica a dois orifícios da placa (1 gota por cavidade);
5. A seguir, com outra pipeta conta-gotas limpa, adicionar 1 gota da suspensão de hemácias de galinha a cada um dos os orifícios que contém vírus ou solução fisiológica;
6. Agitar suavemente a placa e incubar à temperatura ambiente por 30 minutos. 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 1 gota de hemácias 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 (0,050ml = 1 gota);
- 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 conterá 4 UHA/50µl ?

R.: \_\_\_\_\_

### Reação de Inibição da Hemaglutinação

**Data:** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**Hemácias:** galinha 1%

**Diluyente:** solução fisiológica

**Soros:** A - fase aguda

**Vírus:** Influenza

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 convalescença?

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?

## AULA PRÁTICA Nº 17

### **REAÇÃO DE NEUTRALIZAÇÃO**

#### **INTRODUÇÃO**

Uma partícula viral, após combinação com o anticorpo específico, fica "neutralizada", isto é, torna-se não infecciosa, por bloqueio das estruturas externas, através das quais o vírus se adsorve à membrana celular da célula hospedeira ou por bloqueio da desmontagem do capsídeo viral. Este é o princípio de reação de neutralização. 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 forem específicos para o vírus, este será neutralizado e não ocorrerá infecção das células. No entanto, caso 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 viroses. 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. 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. Assim, por exemplo, existem 3 tipos antigênicos do vírus da poliomielite (tipo I, tipo II e tipo III). Se a amostra de vírus isolado de um paciente, pelas características do efeito citopático for considerado como poliovírus, podemos, através da neutralização, utilizando 3 soros padrões tipo específicos (soro anti-pólio I, soro anti-pólio II e soro anti-pólio III), saber a que tipo pertence essa amostra, isto é, qual o sorotipo do vírus.

A reação de neutralização para dosagem de anticorpos é feita através da incubação dos soros dos pacientes com vírus padrões conhecidos, mantidos em laboratório, verificando quais os vírus que estes soros neutralizam, portanto, para quais vírus têm anticorpos. 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.

Devem ser colhidas, de um mesmo paciente, duas amostras pareadas de soro, uma no início da doença e outra duas semanas após a primeira. Fazendo-se a dosagem de anticorpos,

se houver um aumento de título de anticorpos, na segunda amostra, de pelo menos 4 vezes em relação à primeira, temos um diagnóstico seguro de infecção atual, pelo vírus utilizado no teste. A este aumento de título, de pelo menos 4 vezes, em duas amostras de soro consecutivas, dá-se o nome de seroconversão.

**Exercício prático:**

**a. Caso clínico**

Uma criança de 5 anos de idade foi hospitalizada com sintomas indicativos de meningite. Em alguns dias, a paciente desenvolveu dores e espasmos musculares, seguidos de paralisia dos membros inferiores.

No momento da internação, foram coletadas amostras de fezes (R96-110), *swab* de garganta (R96-111) e amostras de sangue (R96-112). Após 15 dias, foi coletada nova amostra de sangue (R96-150).

A amostra de fezes (R96-110) foi diluída e inoculada em células. Após 24 h, foi observado efeito citopático (ECP) caracterizado por arredondamento das células e descolamento das mesmas da superfície do tubo, sugestivo de enterovírus. Foi colhido o sobrenadante de cultura do tubo, com efeito citopático positivo.

**b. Titulação do vírus isolado (sobrenadante da cultura celular com ECP positivo)**

1. O vírus isolado foi diluído, na base 10, de  $10^{-1}$  até  $10^{-6}$ ;
2. As diluições foram inoculadas em duas cavidades da microplaca de fundo chato (fileiras A e B, colunas 1 a 6);
3. Uma suspensão de células GMK (rim de macaco), contendo 200.000 células/ml foi adicionada à placa, 50 µl por cavidade. As cavidades G1, G2, H1 e H2, foram semeadas apenas com células, para controle;
4. Após 48 horas de incubação a 37°C, as células foram fixadas com formalina 10% e coradas com solução de cristal violeta 0,01%.

**c. Protocolo para leitura:**

Diluição do vírus		$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$
		1	2	3	4	5	6
Amostra r96-110	A						
	B						

		<b>1</b>	<b>2</b>
<b>Células Controle</b>	<b>G</b>		
	<b>H</b>		

**Definições:**

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

**Dose infectante de cultura de tecido (DICT):** na diluição correspondente ao título, existe 1 DICT/volume inoculado. O padrão internacional para execução da reação de neutralização determina a utilização de 100 DICT/volume inoculado.

**QUESTÕES PARA RELATÓRIO**

1. Qual o título do vírus presente na amostra R96-110?
2. Qual a diluição do vírus que contém 1 dose infectante cultura de célula/25 µl (DICT/25 µl)?
3. Qual diluição do vírus deverá ser utilizada na reação de neutralização para identificação do vírus? Quantas DICT/25 µl conterà esta diluição?
4. Porque é necessário fazer um controle de células?

**d. Reação de neutralização para tipagem do vírus isolado:**

1. O vírus a ser tipado foi diluído de forma a conter 100 doses infectantes (100 DICT/25µl);
2. Os soros-padrão antipólio I, antipólio II e antipólio III, assim como uma amostra de soro normal de coelho, foram colocados na placa, nas cavidades C1, C2, D1, D2, E1 E2, F1 e F2, de acordo com o protocolo abaixo. Cada cavidade recebeu, a seguir, 25 µl do vírus 100 DICT;
4. A placa foi incubada por 1 hora à temperatura ambiente;
5. Uma suspensão de células GMK, contendo 200.000 células/ml foi adicionada a todas as cavidades utilizadas, inclusive controles, 50µl por cavidade;

6. Após 48 horas de incubação a 37°C, as células foram fixadas com formalina 10% e coradas com solução de cristal violeta 0,01%.

**e. Protocolo para leitura:**

**Reação de neutralização para dosagem de anticorpos neutralizantes antivírus da poliomielite tipo I:**

1. As duas amostras de soro do paciente (R96-112 e R96-150) foram diluídas de 1/4 até 1/128 e cada diluição foi adicionada à microplaca, em duplicata, 25 µl por cavidade;
2. Vírus padrão pólio I foi diluído de forma a conter 100 DICT/25 µl e foi adicionado a cada uma das cavidades contendo as diluições do soro do paciente;
3. Como controle, nas cavidades E11 e E12, o vírus padrão diluído foi adicionado de 25 µl de soro padrão anti-pólio I;
4. Nas cavidades F9, G9, F10, G10, F11, G11, F12, G12 foi feita nova diluição do vírus padrão, até 10<sup>-6</sup>, para controle de vírus;
4. As misturas vírus e soros foram incubadas por 1 hora à 37°C;
5. A seguir, uma suspensão de células GMK, contendo 200.000 células/ml foi adicionada a todas as cavidades utilizadas, inclusive nas H9, H10, H11 e H12, para controle de células;
6. Após 48 horas de incubação a 37°C, as células foram fixadas com formalina 10% e coradas com solução de cristal violeta 0,01%.

Diluições do soro		1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
		7	8	9	10	11	12
Soro R96-112	A						
	B						
Soro R96-150	C						
	D						
Polio I 10 <sup>-3</sup> + anti-pólio I	E						
	F						
Controles de vírus	G						
Controles de células	H						

### **QUESTÕES PARA RELATÓRIO**

7. Qual o título de anticorpos do soro da fase aguda (R96-110)?
8. Qual o título de anticorpos do soro da fase convalescente (R96-150)?
9. Este resultado significa soro-conversão? Por quê?
10. Por que é necessário confirmar o resultado do isolamento viral com a sorologia, utilizando soros pareados, um de fase aguda e outro de fase convalescente?

## **AULA PRÁTICA Nº 18**

### **DIAGNÓSTICO RÁPIDO DAS VIROSES**

#### **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 anti-soros específicos. A identificação de um vírus pelos métodos clássicos leva, no mínimo, duas semanas e até 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 o rotavírus e adenovírus, que são de difícil cultivo. As principais limitações da microscopia eletrônica são: a disponibilidade do microscópio, aparelho caro, 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:

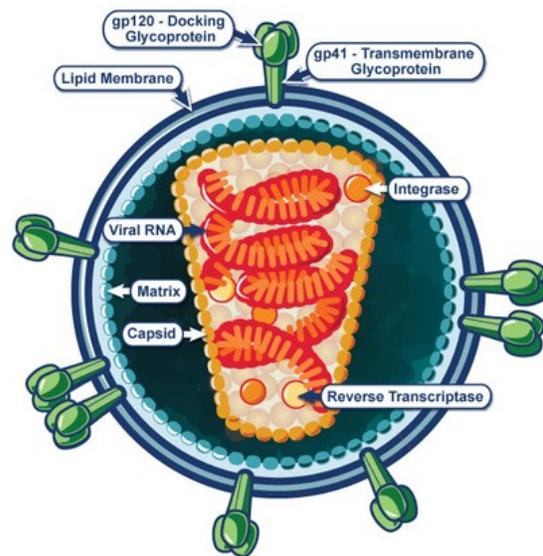
- a reação de hemaglutinação: aplicada no diagnóstico de vírus do sarampo, da rubéola, da influenza etc ou para a detecção de anticorpos contra estes vírus;

- o ensaio imunoenzimático: utilizado para detecção de antígenos virais ou anticorpos contra hepatites, rotavírus, adenovírus, citomegalovírus, HIV etc;
- PCR: importante na determinação da carga viral do HIV, mas tem sido padronizada para a detecção de inúmeros vírus.

### 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 capsídeo, (em forma de cone) e pela matriz, de morfologia esférica. O capsídeo 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 a transcriptase reversa (RT 66 kDa) e a integrase (IN – 32kDa). O genoma viral encontra-se recoberto pela proteína de nucleocapsídeo (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.



**Exercício prático 1: Determinação de anticorpos anti-HIV através do ensaio imunoenzimático.**

**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.

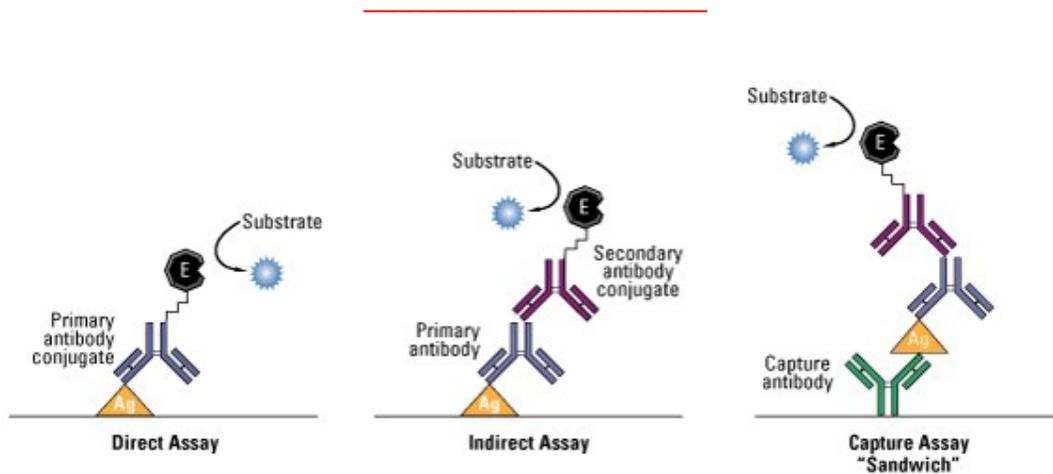
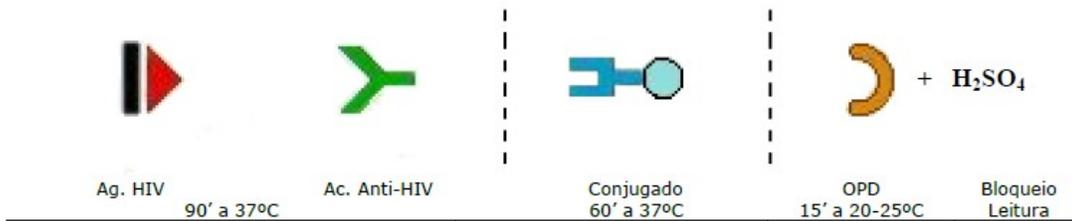
1. Uma microplaca foi sensibilizada com uma mistura de antígenos de HIV: proteínas p24 e gp160 (precursora da gp120 e da pg41) purificadas, obtidas a partir de vírus cultivados em células. Esta mistura de **antígenos virais foi distribuída nas fileiras A, C, E e G da placa;**
2. Como controle de especificidade 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-marron.

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

Princípio do teste: sanduíche indireto ELISA



Tipo de ensaio realizado em aula

## **Exercício prático 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, porém, grande sensibilidade, é comumente utilizada apenas como teste confirmatório, sendo o ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizado rotineiramente como teste de triagem.

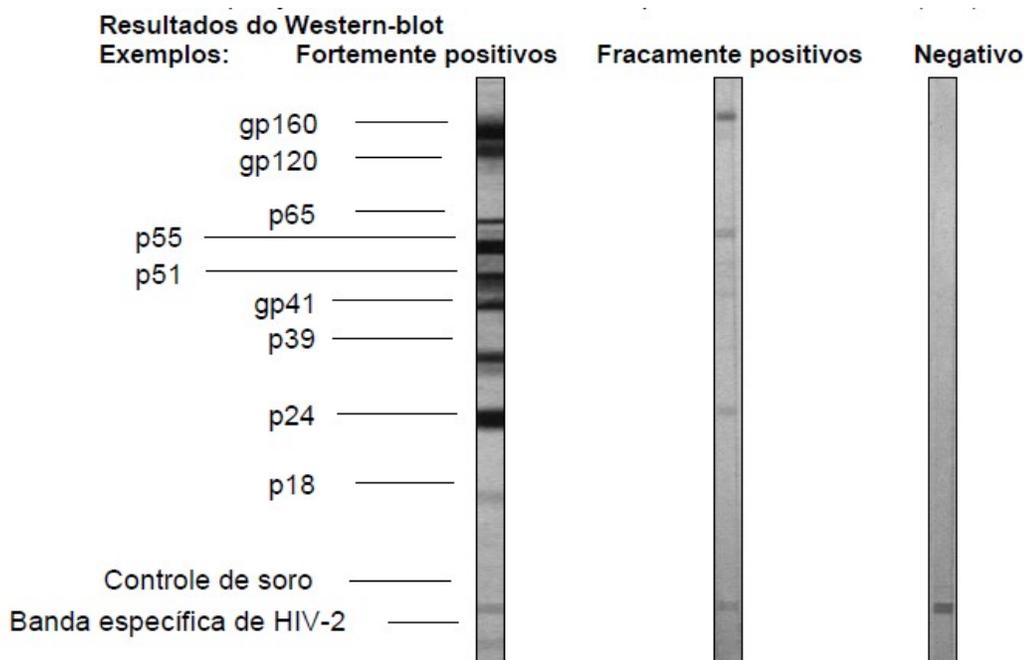
O princípio da reação é o mesmo do ensaio imunoenzimático, mas na reação Western-blot as proteínas virais são separadas pelo sua massa (kDa) em tiras de nitrocelulose. O preparo destas fitas, contendo as proteínas virais, é feito pelas indústrias produtoras de kits de diagnóstico. No laboratório clínico, 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 protéicos 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 à 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 protéicas 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).



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

### QUESTÕES PARA RELATÓRIO

#### Parte 1:

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

#### Parte 2.

1. Determine o diagnóstico final para cada amostra analisada.