

DISCIPLINA BACTERIOLOGIA

BMM 0584

DOCENTES COORDENADORES:

Profs. Rita C. Café Ferreira ritacafe@usp.br

Jorge Timenesky joti@usp.br

Luís C. S. Ferreira lcsf@usp.br

DOCENTES COLABORADORES:

Profs. Luiziana Ferreira lukneif@icb.usp.br

Gabriel Padilha gpadilla@icb.usp.br

Robson F. de Souza rfsouza@usp.br

Técnico Bacteriologia

Eduardo Gimenes Martins egimenes@usp.br

Monitora PAE

Bárbara R. C. Armellini barbara.armellini@usp.br

Prática 1 - Microscopia - Morfologia e Citologia Bacteriana

Material: lâminas com esfregaços de diferentes espécimes, já coradas, e óleo de imersão.

Observação ao microscópio ótico, objetiva de 100X (as lâminas já estarão focadas!).

- 2a. Depositar uma gota de óleo de imersão no centro do esfregaço corado
- 2b. Colocar a lâmina no microscópio
- 2c. Imergir a lente da objetiva de imersão (100X) no óleo, até encostá-la na lâmina
- 2d. Levantar ao máximo o condensador e abrir totalmente o diafragma
- 2e. Focalizar com o macrométrico até notar o campo e, a seguir, aperfeiçoar o foco com o micrométrico
- 2f. Terminada a observação, retirar a lâmina
- 2g. Limpar a objetiva com lenço de papel e desligar o microscópio

Observação das formas bacterianas, arranjos e estruturas:

- 3a. Cocos Gram-positivos em cadeias (estreptococos)
- 3b. Cocos Gram-positivos em cachos (estafilococos)
- 3c. Bacilos Gram-positivos
- 3d. Cocobacilos Gram-negativos
- 3e. Cocos Gram-negativos (*Neisseria gonorrhoeae*) em secreção uretral
- 3f. Esporos (coloração de Wirtz)
- 3g. Espiralados (técnica de Fontana-Tribondeau, impregnação com sais de prata)
- 3h. Cápsula (coloração negativa da cápsula)

4. Desenhar a morfologia, arranjo e coloração das bactérias focalizadas e suas estruturas.

5. Qual o aumento final das bactérias observadas?

Prática 2: Técnicas de Semeadura e Isolamento

Esta prática consiste em três atividades complementares:

- 1- Coleta de micro-organismos do ambiente
- 2- Método da estria em placa ou esgotamento
- 3- Método do Espalhamento com alça de Drigalsky.

Semeadura de cultura bacteriana: Conceitos Gerais

Toda vez que se fizer uma semeadura, os seguintes procedimentos devem ser observados:

- A. As alças de vidro (Drigalsky) e de platina deverão ser flambadas antes e depois de qualquer operação de semeadura. A alça de Drigalsky deverá ser esterilizada mergulhando a mesma em uma placa de Petri ou Becker com álcool e, em seguida, levada rapidamente à chama do bico de Bunsen por tempo suficiente para iniciar a combustão do álcool. **Cuidado! Não manter a alça sobre o fogo para que não se quebre.**
- B. A alça de platina, deverá ser colocada na chama do bico de Bunsen, em um ângulo de 45°C, até incandescer.
- C. A alça de platina deverá ser esfriada na parede interna do tubo ou, se for o caso, no meio da placa de Petri ainda não inoculada. A alça de Drigalsky deve ser esfriada na face interna da tampa da placa de Petri antes de entrar em contato com a amostra.
- D. Toda a vez que se fizer uma semeadura em tubos de ensaio, deve-se flambar a boca dos mesmos, imediatamente após a retirada das tampas ou do algodão. A tampa deverá ser retirada com o dedo mínimo da mão que estiver segurando a alça de platina ou a pipeta. Após a retirada da amostra com as células, flambar novamente a boca do tubo, antes de recolocar a tampa.
- E. Não esquecer de identificar as culturas com o número do grupo de trabalho, seja no fundo da placa ou nas paredes dos tubos. Não marcar as tampas, pois elas podem ser trocadas acidentalmente, o que dificultará a posterior identificação do material.
- F. As placas de Petri e os tubos de ensaio deverão ser abertos e semeados próximo ao bico de Bunsen, para evitar contaminações com microrganismos presentes no ar. Em seguida, colocar o material na estufa a 37°C com a parte semeada voltada para baixo (no caso de placas), para evitar que a água que irá se condensar na tampa caia sobre as colônias.

Princípio

Estudos envolvendo a análise de materiais, como alimentos, leite, água e em alguns casos o ar, requerem o conhecimento da quantidade de microrganismos presentes nesses materiais. Diferentes métodos foram desenvolvidos para a quantificação de bactérias, como a contagem direta das bactérias em microscópio ou contadores eletrônicos. Outras abordagens incluem medição da massa celular; medida da turbidimetria da cultura e método da diluição seriada de uma cultura celular, seguida de semeadura em meio sólido (contagem de células viáveis ou unidades formadoras de colônias - U.F.C.).

Técnica de Isolamento de Culturas Puras

Na natureza, as populações microbianas não são homogêneas, porém contêm misturas de várias espécies de bactérias e demais microrganismos. No laboratório, tais culturas mistas podem ser separadas em culturas puras. Estas últimas, contendo um só

tipo de bactéria, são indispensáveis para a identificação e o estudo das propriedades morfológicas, genéticas e bioquímicas da espécie estudada. Nesta prática, utilizaremos técnicas cuja finalidade é produzir colônias individuais. Estas colônias, visíveis macroscopicamente, são massas de bactérias, que resultaram da multiplicação de uma única bactéria depositada na superfície do meio sólido no momento da semeadura. Uma vez que as colônias foram individualizadas e identificadas, elas podem ser transferidas assepticamente para outra placa com meio sólido e assim, obtermos uma colônia ou uma cultura pura. Nesta aula, serão empregados dois métodos de isolamento de bactérias.

2.1 Coleta de microrganismos do ambiente

Para a detecção de microrganismos presentes no meio ambiente, será distribuída para cada grupo 1 placa de Petri contendo meio de cultura rico, solidificado pela adição de ágar (TSA), previamente esterilizado, e também 1 placa do mesmo meio adicionado com antibiótico (ampicilina), e 1 placa do mesmo meio adicionado com antifúngico (anfotericina B). **As 3 placas estão divididas em 3 áreas: A, B e C. As amostras A, B e C deverão ser semeadas de locais distintos utilizando swab umidificado em solução salina, à escolha do aluno (Ex: maçaneta da porta, sola de sapato, notas de dinheiro, boca, umbigo, celular, mochila e etc).**

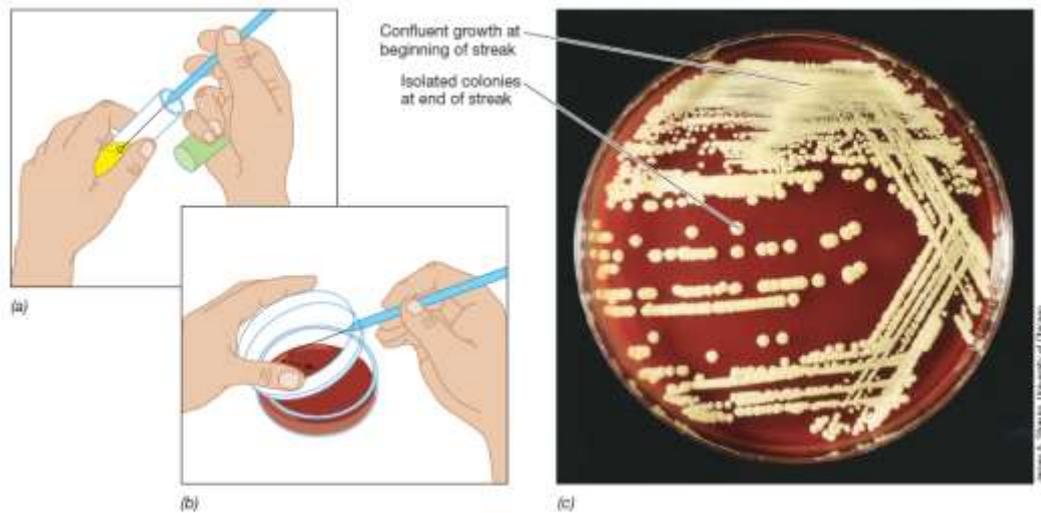
A mesma amostra deverá ser semeada no mesmo quadrante nas 3 placas (TSA, TSA+Amp, TSA+Anf). Alguns grupos poderão deixar as placas abertas durante a aula, para que se depositem microrganismos em suspensão no ar. Ao final da aula, as placas serão incubadas a 30°C até a próxima aula, para permitir o crescimento dos possíveis microrganismos, o que irá originar colônias visíveis a olho nú.

2.2 Método da estria em placa ou esgotamento

O método da estria é rápido e tem como objetivo principal obter uma UFC (Unidade Formadora de Colônia), ou seja, uma colônia derivada de uma única célula. Esta técnica também permite avaliar a pureza da amostra. Essa técnica, porém, não permite a quantificação do número de bactérias presente na cultura sob análise, e seu uso limitado para fins qualitativos como o isolamento de células viáveis.

Procedimento:

Mergulhar a alça de platina, depois de devidamente flambada e resfriada, no meio de cultura com as bactérias. Note-se que dentro da alça fica uma leve camada de líquido (contendo bactérias). Levantar esta alça até a placa de Petri contendo o meio de cultura e fazer uma estria da amostra bem junto à borda da placa. Fazer um pequeno traço na parte superior da placa. **Flambar a alça e esfriá-la**, para iniciar uma nova estria a partir do canto da primeira estria. **Flambar novamente a alça**, esfriá-la e ir fazendo esgotamentos sucessivos até o centro da placa. Incubar as placas a 37°C por 24 h, para poder observar as colônias isoladas. A figura abaixo mostra, de forma simplificada, o processo de estria em placa para obtenção de colônias isoladas (imagem tirada do livro Microbiologia de Brock).



Objetivo:

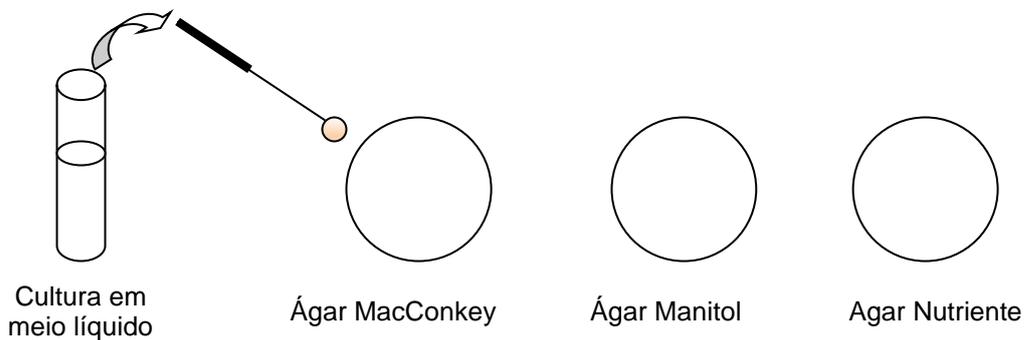
Isolar as amostras bacterianas de uma cultura em meio líquido, usando a técnica de esgotamento por estrias (desenho acima).

Material:

- ◆ 3 placas de Petri contendo meio de cultura sólido (ágar).
- ◆ 1 tubo com cultura de *E. coli* e 1 tubo com cultura de *S. aureus*.

Procedimento:

Semear uma amostra da cultura de cada tubo nas três placas de Petri usando a haste de metal.



Observar:

1. Quantidade de colônias em cada campo
2. Distribuição das colônias nas três áreas estriadas das placas
3. Aspectos morfológicos (aparência) das colônias
4. Características tintoriais: coloração de Gram de cada tipo de colônia.

Complete a tabela abaixo e explique os resultados obtidos em cada meio de cultura. Também compare os seus resultados com os resultados obtidos pelos demais grupos do laboratório.

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

2.3 Método do Espalhamento com alça de Drigalsky

Este método requer uma diluição da cultura antes da sementeira na placa, para que se possam obter colônias isoladas. Este método é utilizado quando se deseja determinar o número de **células viáveis** (vivas) em uma suspensão de bactérias. O procedimento envolve duas etapas importantes:

1. A diluição seriada da cultura de bactérias em condições de esterilidade.
2. A sementeira de amostras das suspensões diluídas em placas de Petri contendo meio de cultura sólido.

Material:

2 Placas de Petri contendo cerca de 20 mL de meio de cultura (Ágar Mitis Salivarius, meio seletivo para *Streptococcus*)
 5 microtubos contendo 0,9 mL de solução salina como diluente
 Pipetas
 Placas de Petri contendo álcool
 Alça de Drigalsky
 Placa para coleta de amostra de saliva.

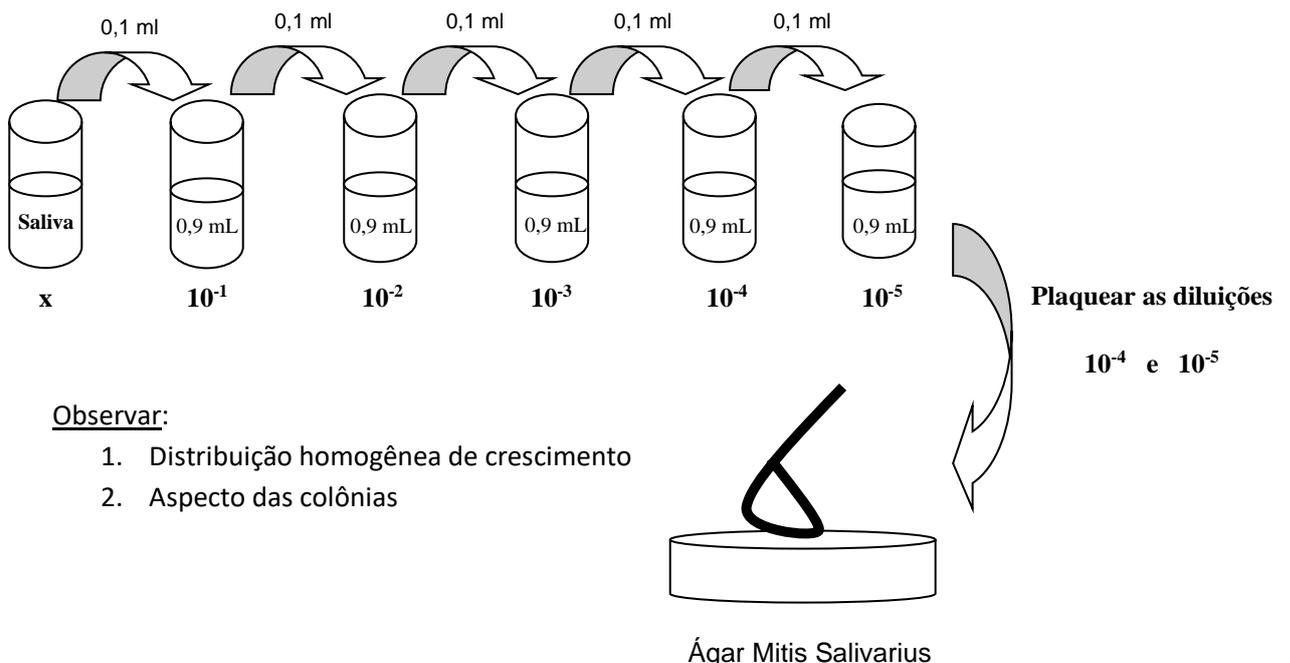
Procedimento:

Dicas:

- **Homogeneizar** por agitação o tubo de cultura em todos os processos. Este processo deve ser repetido toda vez que se for retirar uma amostra dos tubos, diluída ou não.
- As amostras deverão ser retiradas dos tubos de ensaio com o auxílio de pipetas e usando ponteiros estéreis.

Diluição seriada

- Obtenção de amostra de saliva:
 - Um voluntário do grupo cospe em uma placa de petri estéril.
- Numerar os 5 eppendorfs de 1,5 mL e pipetar 900 μ L de solução salina em cada um.
- Retirar, com o auxílio de uma pipeta, uma amostra de 100 μ L (0.1ml) da amostra de saliva não diluída e transferi-la para o **eppendorf 1**, contendo 900 μ L de solução salina (diluição de 10^{-1}). Homogeneizar bem.
- Retirar uma amostra de 100 μ L do eppendorf 1 e transferi-la para o **eppendorf 2**, de modo a obter uma diluição de 10^{-2} . Homogeneizar bem.
- Retirar uma amostra de 100 μ L do eppendorf 2 e transferi-la para o **eppendorf 3**, de modo a obter uma diluição de 10^{-3} . Homogeneizar bem.
- Retirar uma amostra de 100 μ L do eppendorf 3 e transferi-la para o **eppendorf 4**, de modo a obter uma diluição de 10^{-4} . Homogeneizar bem.
- Retirar uma amostra de 100 μ L do eppendorf 4 e transferi-la para o **eppendorf 5**, de modo a obter uma diluição de 10^{-5} . Homogeneizar bem.
- **Semear 100 μ L das diluições 10^{-4} e 10^{-5} no centro das placas de Petri contendo o meio sólido, previamente marcadas com caneta de retroprojektor.**
- Com o auxílio da alça de Drigalsky, previamente mergulhada em álcool, flambada e resfriada, espalhar a gota uniformemente na superfície da placa.
- As placas serão incubadas a 37 $^{\circ}$ C por 24 h em estufa de CO_2 .
- Na próxima aula, serão contadas as colônias crescidas nas diferentes placas, para quantificar o número de células viáveis presentes na cultura original.
- Consultar métodos de cálculo populacional para determinar o número de células na amostra original.



Observar:

1. Distribuição homogênea de crescimento
2. Aspecto das colônias

Perguntas a serem respondidas pelo grupo:

1. Que vantagens os meios de cultura sólidos apresentam para o estudo dos microrganismos?
2. Nesta aula, empregamos apenas meio de cultura rico ou complexo. Existem outros tipos de meios de cultura para crescer bactérias?
3. No 1º experimento da aula, qual foi a finalidade da adição de ampicilina e de anfotericina B às placas contendo o meio de cultura? Poderiam ter sido empregadas outras drogas ao meio de cultura? Estes meios de cultura são classificados de que forma?
4. Qual a diferença entre as técnicas de contagem de células por espectrofotômetro e pelo método de plaquemaneto em placas?
5. Todos os microrganismos coletados do meio ambiente cresceriam no meio de cultura rico? Explique a sua resposta.

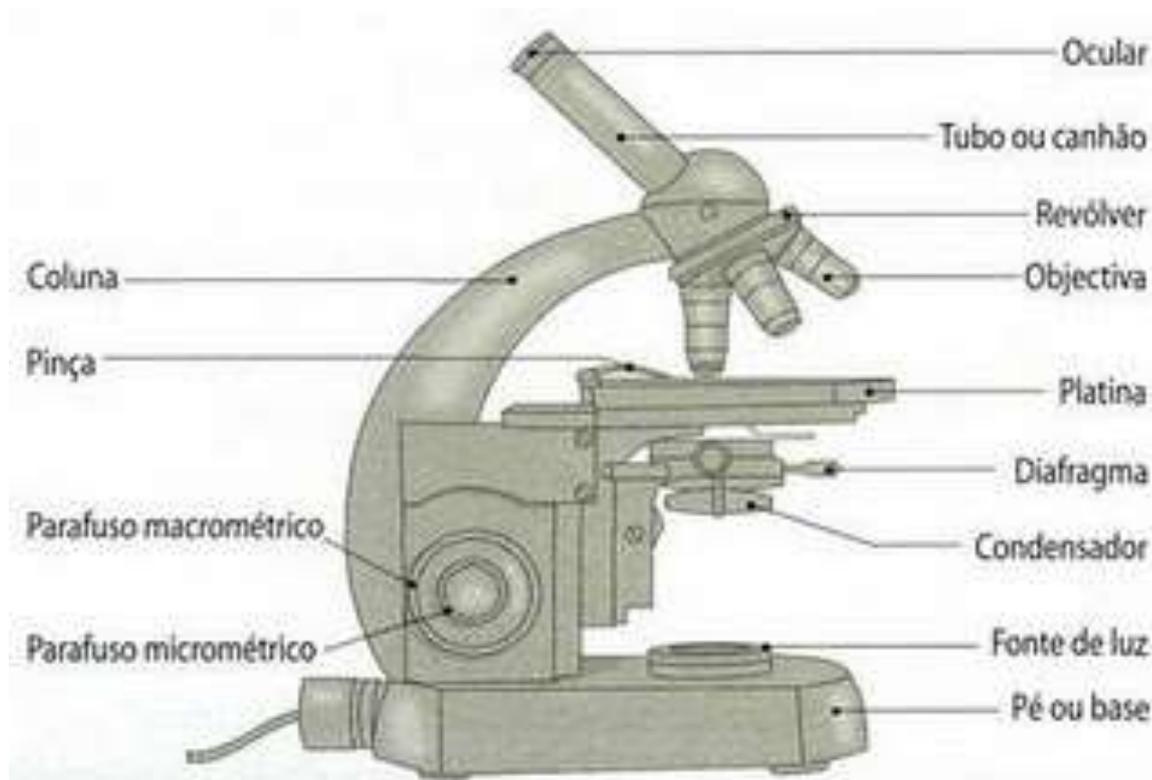
Prática 3. Coloração de Gram

3.1 Introdução à microscopia

Como utilizar o microscópio ótico

Primeiro: conhecer as partes do microscópio (Ver Figura).

- Descer a platina e colocar na objetiva de menor aumento, caso não esteja.
- Colocar a lâmina sobre a platina. Aproximar a lâmina da lente objetiva de 10X com o auxílio do macrométrico até focalizar a imagem. Tome cuidado para que a objetiva não toque a lâmina.
- Após a focagem na objetiva de menor aumento, **girar o revólver** para a próxima objetiva (40X). Ao mudar de objetiva, ajuste novamente a focagem, utilizando o micrométrico.
- Definido o campo, colocar uma gota de óleo de imersão sobre o esfregaço e observar ao microscópio com a lente objetiva de imersão (100X).
- Usar óleo de imersão **somente** na objetiva de 100X. Após a utilização limpar a objetiva com papel macio.



Procedimento:

1. Material: lâminas com esfregaços de diferentes espécimes, já coradas, e óleo de imersão.
2. Observação ao microscópio ótico, **objetiva de 100X**.
3. Observação das formas bacterianas, arranjos e estruturas:
 - 3a. Cocos Gram-positivos em cadeias (estreptococos)
 - 3b. Cocos Gram-positivos em cachos (estafilococos)
 - 3c. Bacilos Gram-positivos
 - 3d. Cocobacilos Gram-negativos
 - 3e. Cocos Gram-negativos (*Neisseria gonorrhoeae*) em secreção uretral
 - 3f. Esporos (coloração de Wirtz)
 - 3g. Espiralados (técnica de Fontana-Tribondeau, impregnação com sais de prata)
 - 3h. Cápsula (coloração negativa da cápsula)
4. Desenhar a morfologia, arranjo e coloração das bactérias focalizadas e suas estruturas.
5. Qual o aumento final das bactérias observadas?

3.2 Técnica de coloração de Gram

Princípio do Gram

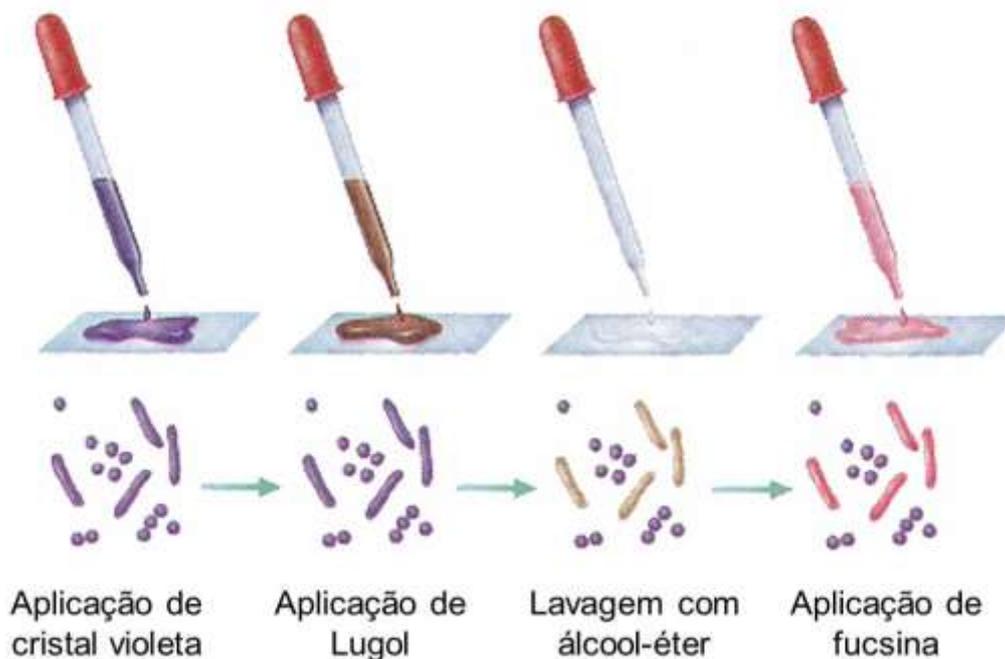
A coloração de Gram foi desenvolvida em 1884, por Hans Christian Gram. É um dos procedimentos de coloração mais utilizados dividindo as bactérias em dois grandes grupos: as bactérias Gram positivas, ou Gram (+), e as bactérias Gram negativas, ou Gram (-). Nesse procedimento, o esfregaço fixado pelo calor é coberto por um corante básico violeta, geralmente, o cristal violeta. O corante confere cor violeta a todas as células e é denominado corante primário. Após um curto período de tempo, o corante violeta é removido e o esfregaço coberto com lugol (I₂+ KI), um mordente que fixa o corante aos componentes celulares. Quando o mordente é lavado os dois tipos de bactérias, Gram (+) e Gram (-), aparecem com uma cor violeta escura ou roxa. Em seguida, a lâmina é lavada com etanol ou com solução etanol-acetona. Esta solução, chamada de solução de descoloração, remove a cor violeta de algumas espécies de bactéria, mas não de outras. Após a remoção do excesso do álcool, a lâmina é recoberta com um segundo corante básico (fucsina com cor rósea). O esfregaço é lavado novamente e, depois de retirado o excesso de água com um papel de filtro, observado ao microscópio.

Na primeira coloração, todas as células coram-se em violeta ou roxo. As bactérias que retêm a cor violeta após o tratamento com álcool são classificadas como Gram (+) e as bactérias que perdem a coloração violeta são classificadas como Gram (-). Como essas últimas perdem a coloração violeta com o tratamento com álcool, elas não poderão ser facilmente observadas. Por isso a fucsina (um corante básico) é aplicada ao esfregaço,

corando essas bactérias com coloração rósea. Surge daí o nome de contra-corante para o segundo corante (fucsina).

Como as bactérias Gram + retêm a cor violeta, elas não são afetadas pela coloração rósea da fucsina. Diferenças estruturais na parede celular das bactérias Gram (+) e Gram (-) afetam a retenção ou a liberação do complexo cristal Violeta-mordente. Entre essas diferenças destaca-se a espessa camada de peptídeglicanano, parede celular das bactérias Gram (+). Ao contrário, a parede das bactérias Gram (-) mostra-se delgada e inclui a membrana externa rica em lipopolissacarídeos(LPS), não encontrado na parede das bactérias Gram (+).

Técnica de Coloração de Gram



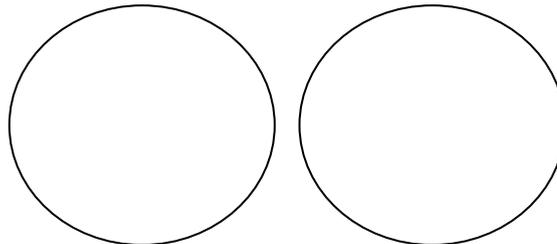
Material:

- **Violeta de Genciana**
Cristal violeta (1 g), Ácido Fênico (2g), Álcool Absoluto (10 ml) e Água Destilada (100 ml).
- **Lugol**
Iodo (1 g), Iodeto de Potássio (2 g) e Água destilada (300 ml).
- **Álcool-acetona**
Álcool etílico (800 ml) e acetona (200 ml)
- **Fucsina Diluída**
Fucsina (0,25 g em 10 ml álcool etílico) e Água destilada (90 ml)

Procedimento

- a. Esterilizar a alça de platina na parte mais quente da chama do bico de Bunsen (limite da chama azul) até incandescer, formando um ângulo de 45°C.
- b. **Preparo do esfregaço de culturas de bactérias:** Colocar uma gota (ou colônia) de cada **amostra** sobre uma lâmina de vidro, misturar gentilmente com o auxílio da alça (um micro-organismo para cada lâmina). Esperar secar o esfregaço. Fixar o esfregaço pelo calor flambando rapidamente a lâmina. Esperar esfriar a lâmina para não ocorrer a cristalização do corante.
- c. **Técnica da coloração de Gram:**
 1. Colocar o corante Violeta de Genciana sobre o esfregaço e deixar em repouso por **1 minuto**.
 2. Escorrer o corante da lâmina. **Não lavar a lâmina com água**. Adicionar a solução de lugol em quantidade suficiente para cobrir todo o esfregaço. Esperar por um minuto.
 3. Escorrer o lugol da lâmina e em seguida lavar com água.
 4. Descorar o esfregaço gota a gota com álcool-acetona por **15 segundos**. **Não** gotejar diretamente sobre o esfregaço.
 5. Corar o esfregaço com fucsina diluída e esperar por **1 minuto**. 6. Lavar a lâmina com água corrente e secar com papel de filtro. **Não** esfregar a lâmina com o papel.
- d. Visualizar o material utilizando o microscópio ótico (**Seção 3.1**).
- e. Observe e anote a coloração e morfologia das bactérias.

Observação e anotação dos resultados



Amostra A

Amostra B

Descrição dos resultados:

QUESTÕES PARA O RELATÓRIO

1. Descreva a estrutura e composição da parede celular das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.
2. Explique o fundamento da técnica da coloração de Gram. Qual a etapa crucial na execução da coloração de Gram.
3. Desenhe e Descreva cada tipo de bactéria visualizada na aula prática.
4. Durante a aula prática você teve oportunidade de utilizar microscópios óticos convencionais (microscopia de luz) para observar a forma e a reação frente a um procedimento de coloração de diferentes espécies de bactérias. Que outras técnicas de microscopia são empregadas no estudo de bactérias? Cite pelo menos duas técnicas e comente sobre o princípio de ação de cada uma delas.
5. De dois exemplos de bactérias que a coloração de Gram não funciona e diga como é feito para fazer sua coloração.

Prática 4 - Identificação Bacteriana – Provas Bioquímicas: Família Enterobacteriaceae

Objetivo: Analisar distintas reações bioquímicas e sua utilização como método diagnóstico para enterobactérias

Introdução:

Bactérias pertencentes à mesma família mas de gêneros distintos podem ser eventualmente identificadas baseando-se em características bioquímicas como a capacidade de utilização de diferentes fontes de carbono e expressão de enzimas específicas (urease, deaminases etc.). Testes bioquímicos são uma das bases para a identificação de bactérias patogênicas em laboratórios de análises clínicas, juntamente com outras provas complementares (sorologia, PCR etc.). Na aula de hoje serão utilizadas provas bioquímicas para a identificação de bactérias da família *Enterobacteriaceae* particularmente para os gêneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Shigella*, *Salmonella*, *Proteus*.

Procedimento

Dia 1

Cada grupo receberá uma placa de meio TSA com uma cultura pura identificada apenas por um número. Em seguida os alunos deverão:

1. Com a alça bacteriológica, tocar uma colônia e inocula-la na placa MacConkey (estriar para isolar colônias) e nos tubos da série bioquímica contendo os meios EPM, MILI e CITRATO.
2. Incubar por 24 h a 37°C

Dia 2

Leitura da série bioquímica dos resultados e identificação dos gêneros bacterianos.

1) Agar MacConkey

Colônias lactose positiva: coloração vermelha

Colônias lactose negativa: incolores

Princípio: o ágar MacConkey é composto por peptona de caseína, peptona de carne, sais biliares, lactose, cloreto de sódio, vermelho neutro, cristal violeta, ágar bacteriológico e água destilada. Somente bactérias adaptadas à sobrevivência em ambientes com concentrações de sais biliares equivalentes à do ágar MacConkey conseguirão proliferar neste meio de cultura. Para estas, será imposta a condição de lactose como único carboidrato disponível. As bactérias capazes de metabolizar a lactose liberarão ácido no meio de cultura, o que diminuirá o pH e fará com que o indicador vermelho neutro mantenha sua coloração avermelhada, mantendo o meio e as colônias destas bactérias também avermelhadas. No entanto, se as bactérias não forem capazes de utilizar a lactose como fonte primária de energia, os aminoácidos presentes nas peptonas fornecerão energia após serem metabolizados. Neste metabolismo, o produto será amônia, que liberada no meio, provocará o aumento do pH, fazendo com que o indicador mude a coloração do ágar MacConkey para amarelo e as colônias ficarão incolores.

2) meio EPM

Os testes de produção de CO₂, H₂S e urease são verificados na base. O teste para a enzima L-triptofano desaminase é observado na superfície do meio

Obs: todas as enterobactérias fermentam glicose

Leitura das Provas

1. Glicose

A fermentação da glicose pode ser observada pela presença de bolhas de gás (CO₂):



Prova positiva: base amarela com presença de bolhas de ar

Prova negativa: base amarela sem bolhas de ar

2. H₂S

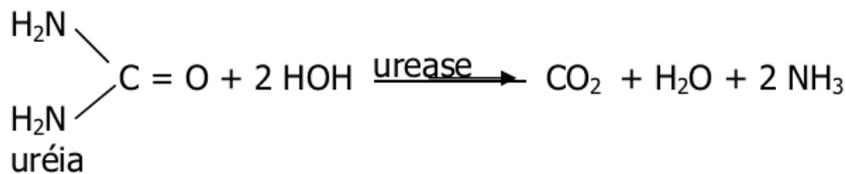
Na₂SO₃ → H₂S (reage com Fe dando coloração preta)

Prova positiva: base preta

Prova negativa: base amarela ou inalterada

3. Urease

Princípio: As bactérias que sintetizam urease convertem a uréia em amônia e gás carbônico.



A amônia alcaliniza o meio, alterando a cor do indicador de pH azul de bromotimol de amarelo para azul.

Prova positiva: base azul

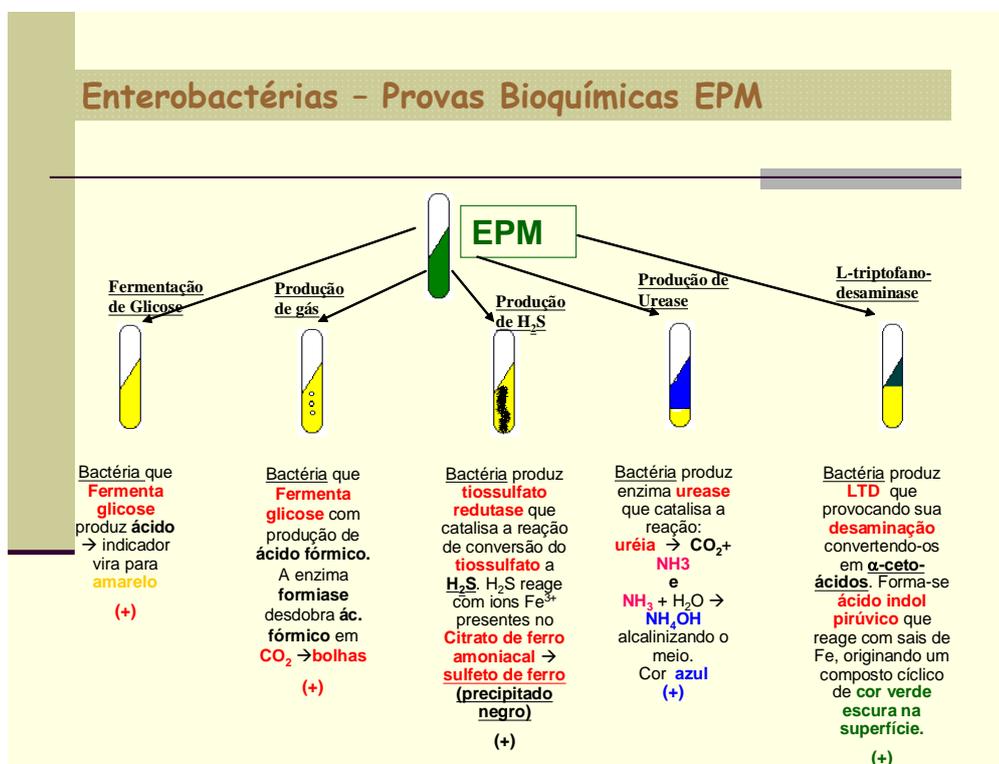
Prova negativa: base amarela ou inalterada

4. Triptofano desaminase

Princípio: A desaminação oxidativa do L-triptofano catalisada pela L-triptofano desaminase resulta na formação de cetoácido que, em presença de ferro, alcaliniza o meio, alterando a cor do indicador de pH azul de bromotimol na superfície para verde escuro.

Prova positiva: superfície verde escuro

Prova negativa: superfície azulada, amarelada ou inalterada



3. **Meio de Mili** (Motilidade, Indol e Lisina decarboxilase)

O teste de motilidade e lisina decarboxilase são verificados na base e o teste de indol é feito adicionando-se algumas gotas de reativo de Kovac (dimetilaminobenzaldeído) na superfície do meio.

Leitura das provas

1. **Motilidade**

Prova positiva: meio turvo

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

2. **Indol**

Princípio: Indol é um componente do aminoácido triptofano. Algumas bactérias conseguem utilizar triptofano como nutriente com a ajuda da enzima triptofanase que catalisa a conversão de triptofano em indol. Quando triptofano é degradado, a presença de indol pode ser detectada através de sua reação com reagente de Kovac, que é amarelo, dando origem a uma coloração avermelhada na superfície do tubo.

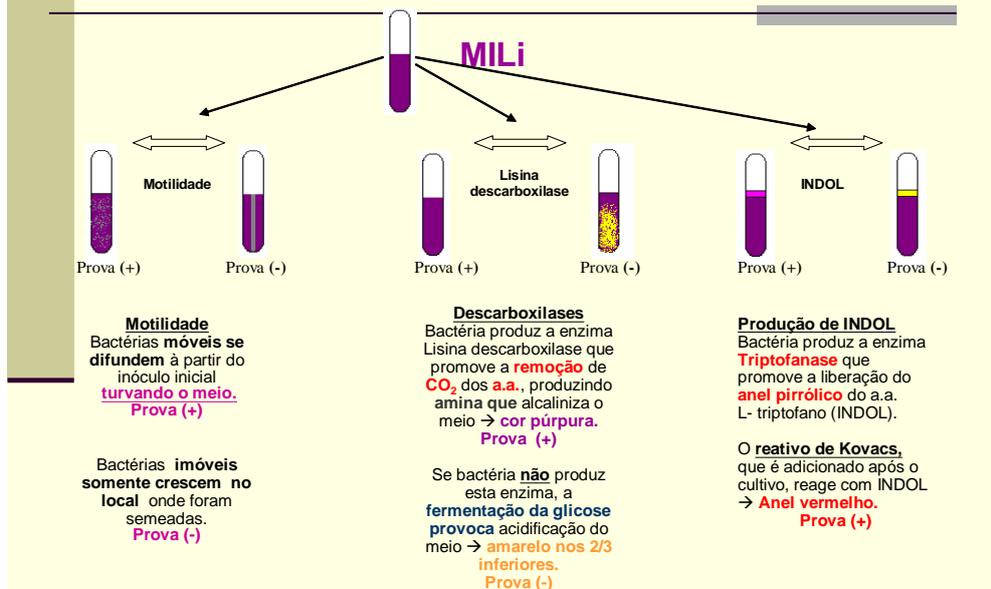
Prova positiva: coloração vermelha

Prova negativa: coloração amarela

3. **L-lisina decarboxilase**

Princípio: A descarboxilação da lisina elimina a parte ácida do aminoácido produzindo aminas alcalinas, que elevam o pH do meio e transformam a cor amarela do indicador de pH (bromocresol) em roxa.

Enterobactérias - Provas Bioquímicas - Mili



4. Agar Citrato de Simmons

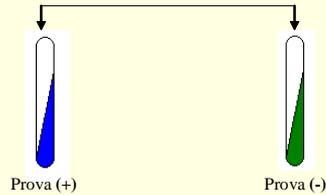
Princípio: Este meio de cultura possui citrato como única fonte de carbono. Bactérias que podem utilizar citrato como fonte de carbono crescem em Agar citrato e provocam alcalinização do meio devido à liberação de CO₂ ao final da reação. O indicador de pH (azul de bromotimol) passa de verde a azul (pH>7.5). Observe que quando não ocorre utilização do citrato, não há crescimento bacteriano, pois citrato é a única fonte de carbono do meio.

Prova positiva: coloração azul

Prova negativa: coloração do meio inalterada

Enterobactérias - Provas Bioquímicas - Citrato de Simmons

Citrato de Simmons



O meio Citrato de Simmons contém **Citrato de sódio** como única fonte de **Carbono**:

Bactéria que **são capazes** de oxidar **Citrato** produzem CO_2 que se combina com **sódio** e água formando **carbonato de sódio**
→ **o meio se torna alcalino** → **indicador azul de bromotimol vira para Cor Azul = Prova (+)**

Bactérias que **não são capazes** de utilizar o **Citrato** como única fonte de carbono, não crescem neste meio e o meio permanece **INALTERADO**.
Cor Verde e Ausência de Crescimento = Prova (-)

Baseado nas figuras acima e tabela a seguir, identifique o gênero da bactéria analisada por seu grupo.

Pergunta a ser respondida no relatório

Os ensaios feitos na aula prática demonstraram alguns princípios empregados na identificação/diagnóstico de bactérias de interesse médico. Pesquise sobre as técnicas empregadas para o diagnóstico de bactérias em laboratórios de análise clínica e as compare com o que foi feito em sala de aula.

Tabela: Identificação bioquímica parcial de ENTEROBACTÉRIAS.

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

Obs.: LTD: L-triptofano desaminase

Prática 5 - Antibiograma

Teste de sensibilidade dos microrganismos aos agentes antimicrobianos

Agentes quimioterápicos são agentes químicos utilizados no tratamento de doenças infecciosas. Seus modos de ação implicam na interferência com o metabolismo microbiano sem causar efeito lesivo à célula hospedeira.

Antibióticos - São sintetizados e secretados por certas bactérias, actinomicetes e fungos que matam ou inibem o crescimento de outros microrganismos. Atualmente, alguns antibióticos são sintetizados ou modificados em laboratórios, contudo, originam-se dos organismos vivos.

Exemplos:

Ampicilina- Impede a incorporação do ácido murâmico no componente mucocomplexo da parede da célula, inibindo assim, a síntese da parede celular.

Estreptomicina - Tem afinidade pelos ribossomos bacterianos, causando erros de leitura no códon do mRNA, interferindo assim, na síntese proteica.

Cloranfenicol - Tem afinidade pelos ribossomos bacterianos, impedindo a formação da ligação peptídica entre os aminoácidos durante a síntese proteica.

Tetraciclina - Tem afinidade pelos ribossomos bacterianos, impedindo a ligação de hidrogênio entre o anticódon no complexo aminoácido-tRNA e o códon no mRNA durante a síntese proteica.

Agentes ou drogas sintéticas são agentes quimioterápicos sintetizadas em laboratório.

Exemplos:

Sulfadiazina (sulfanamida) - tem o efeito de inibição competitiva. Isto é, o componente ativo da droga, age como um antimetabólico que compete com um metabólito essencial, o ácido p-aminobenzóico (PABA), durante a síntese do ácido fólico na célula bacteriana. O ácido fólico é uma coenzima celular essencial para a síntese de aminoácidos e purinas.

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

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

Material:

- Cultura bacteriana crescida por 18 horas (10^5 células por mL);
- Placas com meio de cultura Müller-Hinton;
- Discos de antibióticos;
- Cotonetes e pinças esterilizados.

Procedimento:

1. Agitar bem a cultura bacteriana (*Staphylococcus aureus*);
2. Umedecer o cotonete na suspensão bacteriana, retirando o excesso ao apertar o cotonete contra a parede interna do tubo;

3. Espalhar a suspensão bacteriana em toda a superfície do meio de cultura, de modo homogêneo, inclusive nas bordas;
4. Colocar os discos de antibióticos com auxílio da pinça sobre a superfície do meio e de modo equidistante – usar 5 antibióticos por placa;
5. Incubar as placas a 37^oC por 18 horas.
6. Utilizando um “Swab” aplicar por toda a superfície da placa de Petri a cultura bacteriana crescida;
7. Aplicar os discos de antibióticos na superfície da placa utilizando a pinça.

Resultados

Leitura e interpretação:

- Verificar a presença ou ausência de halo de inibição ao redor dos discos.
- Medir o DIÂMETRO dos halos, vide figura a seguir
- Verificar se o microorganismo é resistente ou sensível

A seguir tem uma tabela que mostra alguns halos de inibição de crescimento para alguns antibióticos testados em aula.

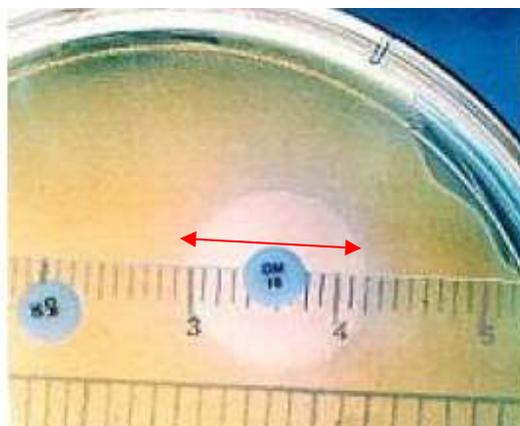


Tabela EuCast para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213
 β -lactamase-producing strain (weak) (NCTC 12973, CIP 103429, DSM 2569, CCUG 15915, CECT 794)

Antibiótico	Conc.	Diâmetro de inibição (mm)	
		Alvo <i>Calculado pelo EUCAST</i>	Faixa <i>Validado pelo EUCAST</i>
Ampicilina	2 ug	18	15 a 21
Cefoxitina	30 ug	27	24 a 30
Cloranfenicol	30 ug	24	20 a 28
Gentomicina	10 ug	22	19 a 25
Tetraciclina	30 ug	27	23 a 31
Tobramicina	10 ug	23	20 a 26

Referência: (EUCAST QC Tables v. 8.0, valid from 2018-01-01)

Tabela EuCast para *Staphylococcus ssp*
 EUCAST Clinical Breakpoint Tables v. 8.1, valid from 2018-05-15

Antibiótico	Conc.	Diâmetro de inibição (mm)	
		Sensível ≥	Resistente ≤
Ampicilina	2 ug	18	18
Cefoxitina	30 ug	22	22
Cloranfenicol	30 ug	18	18
Gentomicina	10 ug	22	22
Tetraciclina	30 ug	22	19
Tobramicina	10 ug	22	22

Referência

http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_8.1_Breakpoint_Tables.pdf

Resultados:

Completar de acordo com os resultados obtidos na prática. Preencher com o valor do diâmetro do halo de inibição em mm.

Antibióticos	Diâmetro do halo	Conclusão
Ampicilina		
Cefatoxina		
Cloranfenicol		
Gentamicina		
Tetraciclina		
Tobramicina		

Perguntas a serem respondidas no relatório

- 1- Que procedimentos deveriam ser tomados para a determinação da concentração inibitória mínima (MIC) dos antibióticos testados?
- 2- Que fatores podem interferir no perfil de sensibilidade a antibióticos em uma linhagem bacteriana?
- 3- A resistência a antibióticos expresso por uma linhagem bacteriana pode ser considerada um fator de virulência? Justifique.
- 4- Quais são os halos para os demais antibióticos (Resistente, Intermediário e Sensível), que não estão descritos na Tabela de Kirbe & Bauer acima.
- 5- Pesquise qual é o painel de antibióticos referenciado pela ANVISA e pela OMS para análise clínica. Compare com o que foi feito.
- 6- Leiam as normas descritas no site do EuCAST: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ e http://www.eucast.org/guidance_documents/;

TABELA I

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

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

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

TABELA COMPLEMENTAR II

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

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

REFERÊNCIAS:

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

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

Prática 6 - Controle Microbiano

Esta prática consiste em 3 atividades: a avaliação da atividade antibacteriana de desinfetantes químicos, a antisepsia das mãos e a atividade bactericida do calor (fervura).

4.1. Atividade antibacteriana de desinfetantes químicos

Material:

- Tubo 1: amostra de *E. coli*
- Tubo 2: amostra de *B. subtilis*
- Duas séries de 3 tubos, por amostra: tubo A (desinfetante concentrado), tubo B (desinfetante diluído) e tubo C (solução fisiológica, a ser usada como controle positivo).
- Duas placas de ágar nutriente, para as amostras 1 e 2. Cada placa será dividida em 3 partes, cada parte correspondendo a um dos tratamentos (A, B e C).

Procedimento:

- Transferir 0,25 mL de cultura para cada tubo contendo 0,25 mL de um dos desinfetantes testados ou solução fisiológica (tubos A-B-C)
- Homogeneizar os tubos e aguardar 10 minutos.
- Transferir uma alçada de cada tubo para respectiva área da placa de Petri.
- Repetir o procedimento anterior com *Bacillus subtilis* e com *E. coli*.
- Identificar as placas semeadas.

Resultados:

Indicar a presença ou ausência de crescimento

Organismo	Desinfetante		Controle solução fisiológica
	concentrado A	diluído B	
<i>Escherichia coli</i>			C
<i>Bacillus subtilis</i>			

4.2. Atividade bactericida do calor (fervura)

Material fornecido:

- Tubo - 1: caldo com *Escherichia coli*;
- Tubo - 2: caldo com *Bacillus subtilis*;
- Duas placas estéreis com ágar nutriente, divididas em 4 partes.

Procedimento:

- Semear com alça bacteriológica amostra de cada caldo nos respectivos quadrantes
- de cada placa (**controles - tempo 0**).
- Submeter à fervura os 2 tubos por 30 minutos.

- Retirar amostras dos respectivos caldos com alça durante a fervura aos 5, 10 e 30 minutos.
- Semear com alça cada amostragem dos respectivos tubos, nos respectivos quadrantes restantes, identificar as placas e incubar.

Resultados:

tempo / minutos	0	5	10	30
<i>Escherichia coli</i>				
<i>Bacillus subtilis</i>				

4.3. Antissepsia das mãos

Procedimento:

- 2.1. Dividir o fundo da placa de Petri contendo meio de cultura em 3 partes iguais.
- 2.2. Com auxílio de um cotonete, previamente esterilizado e umedecido em solução salina esterilizada, esfregar sobre a pele da palma da mão. A seguir, semear 1/3 da placa com o cotonete e identificar como “mãos sem lavar”.
- 2.3 Aplicar nas mãos álcool em gel 70% e com auxílio de outro cotonete, previamente esterilizado e umedecido em solução salina esterilizada, esfregar sobre a pele da palma da mão e semear outro 1/3 da placa com esse cotonete e identificar como “álcool em gel”.
- 2.4. Em seguida aplicar álcool iodado a 2%, durante 1 minuto, nas palmas das mãos e com auxílio de outro cotonete, previamente esterilizado e umedecido em solução salina esterilizada, esfregar sobre a pele da palma da mão. Semear o último terço da placa com o cotonete e identificar “álcool iodado”.
- 2.5. As placas serão incubadas a 37°C por 24 horas, após este período comparar o crescimento de colônias nas 3 partes da placa.

Perguntas a serem respondidas pelo grupo

- 1 – Como explicar as diferenças de comportamento entre as duas espécies de bactérias testadas?
- 2 – Diferencie desinfecção e esterilização?
- 3 – Pesquise sobre as práticas de esterilização e/ou desinfecção empregadas na indústria farmacêutica e em hospitais e faça uma argumentação sobre o tema.
- 4- Em que condições a sanitização, desinfecção e esterilização são necessárias?