

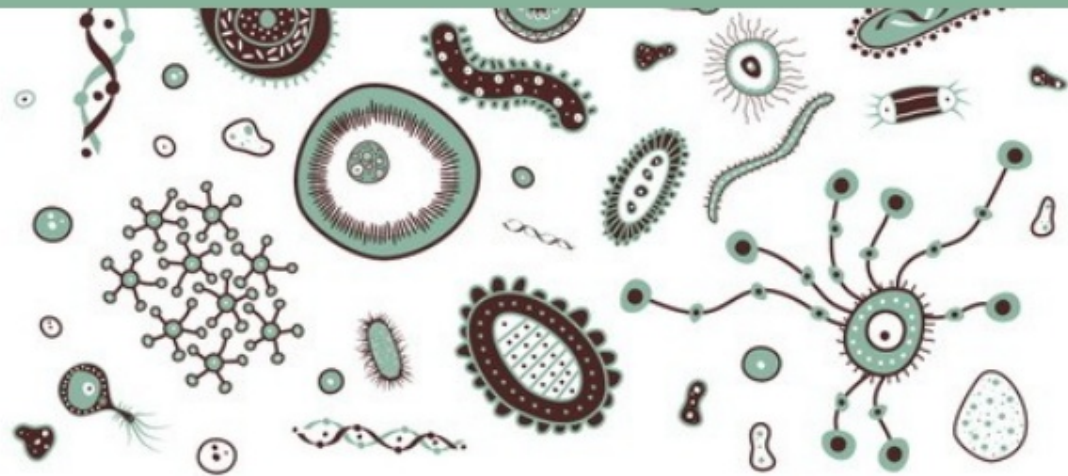


DEPARTAMENTO DE  
**MiCroBiologia**  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**DISCIPLINA MICROBIOLOGIA BMM-0450**



# Apostila de Bacteriologia



**ROTEIRO DE EXERCÍCIOS PRÁTICOS 2024  
FISIOTERAPIA**

## **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. Portar somente material para anotações (caderno, caneta, lápis, marcador de tubos/vidros).
4. Não fumar no interior do laboratório.
5. Não comer, beber, mascar chicletes e não levar as mãos à boca.
6. Trabalhar de maneira sistemática e organizada, sempre com muita atenção.
7. Identificar adequadamente todo o trabalho realizado (placas de petri identificadas com nome e data na parte posterior - não na tampa).
8. Trabalhar com rigorosa assepsia.
9. Descartar o material utilizado nos recipientes/locais apropriados.
10. Não retirar nenhum material ou culturas do ambiente de trabalho.
11. Ao término dos trabalhos, ordenar e desinfetar o local, bem como, não esquecer de desligar o gás e apagar as luzes.
12. Antes de sair do laboratório, lavar sempre as mãos e, caso seja possível, lavar as unhas com escovinha e sabão desinfetante.
13. Comunicar todo e qualquer acidente ao responsável pelo laboratório.
14. Depois de usar o microscópio, desligar a luz e limpar a objetiva com lenço de papel.
15. 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.

## I - 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:

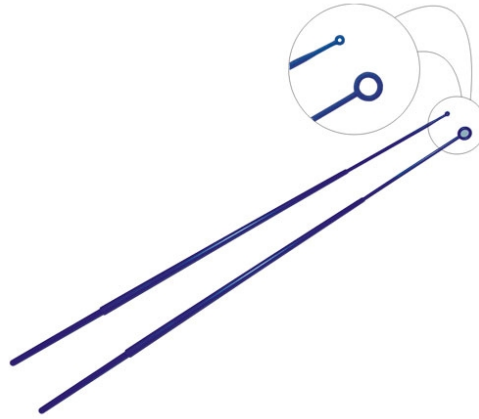
a) Placa de Petri: é uma placa circular de vidro (ou plástico descartável) que é composta de uma base e de uma tampa de superfícies planas. Nesta placa são adicionados os meios de cultura sólidos onde ocorrerá o desenvolvimento dos microrganismos.



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:

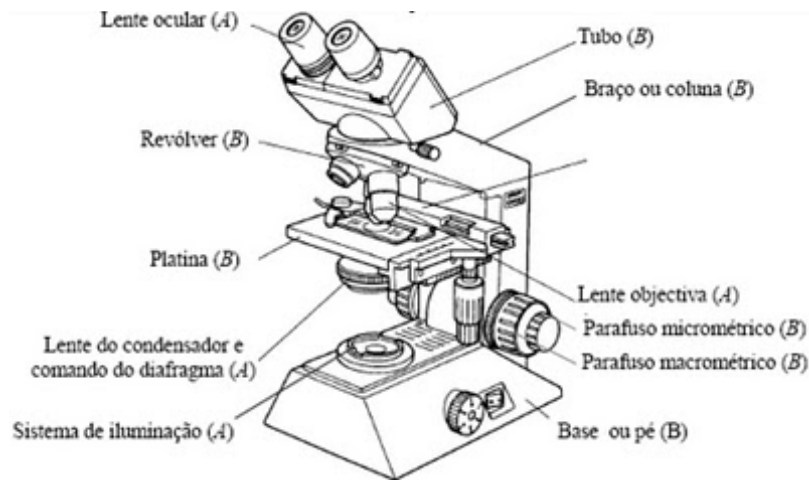
Base: sustenta o microscópio e permite manter a sua estabilidade.

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.**

## **AULA PRÁTICA Nº 1**

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

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 úmido, 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 a cerca de 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 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.

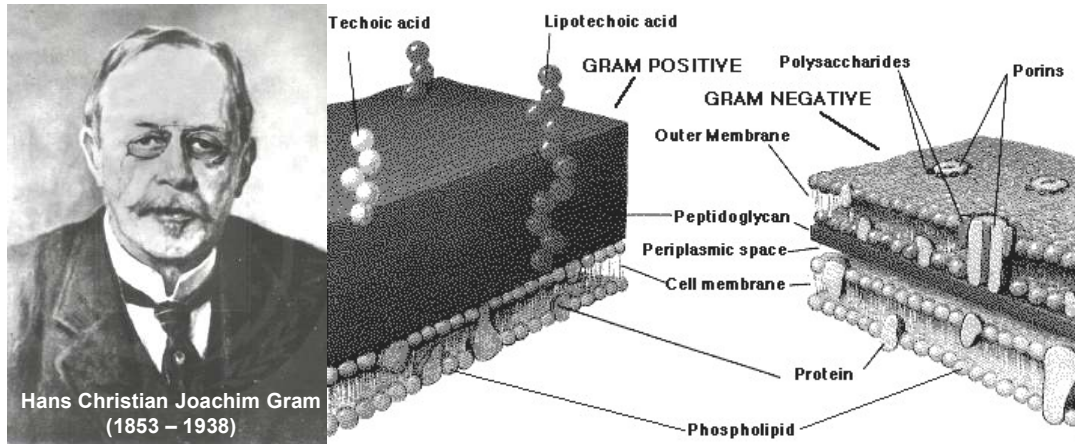
A coloração de Gram foi desenvolvida em 1884, pelo bacteriologista dinamarquês **Hans Christian Gram**. Esta coloração continua entre as mais importantes na rotina do laboratório de Microbiologia. Ela permite dividir as bactérias em dois grupos: **gram-positivas e gram-negativas**. Possibilita, ainda, 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 realizados a partir de amostras coletadas de diferentes locais (orofaringe, celular, dinheiro, sapato etc) “swab estéril”, fazendo um esfregaço em lamina de vidro, fixando e corando.

Adicionalmente, cada grupo deverá observar esfregaços fixados e corados que ficaram disponíveis nos microscópios (aumento 100x)

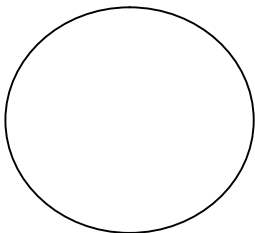
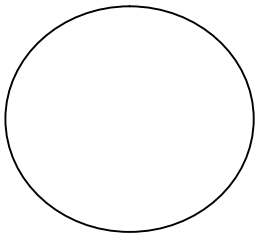
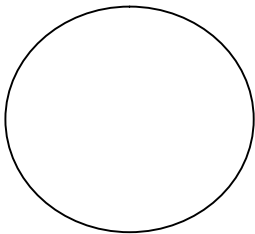
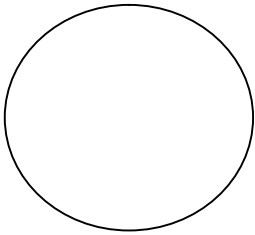
**Técnica:** fazer um esfregaço com as bactérias que se desejam corar (ou com a amostra).

- Cobrir o esfregaço com violeta de genciana, violeta de metil 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):**

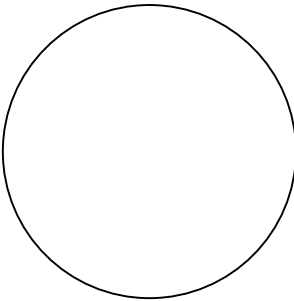
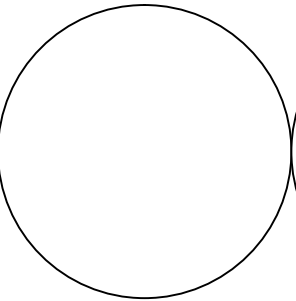
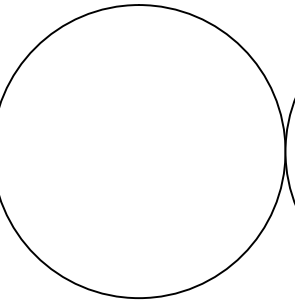
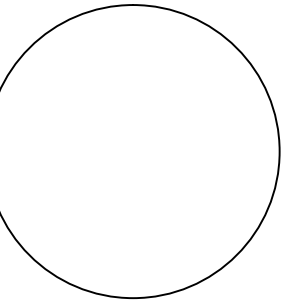


<b>Bactéria (espécie)</b>	<b>Descrição microscópica</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Streptococcus spp.</i>	
<i>Escherichia coli</i>	
<i>Bacillus spp.</i>	

## QUESTÕES PARA RELATÓRIO

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

2. Desenhe cada tipo de bactéria visualizada na aula prática:

			
<p><b><i>E. coli</i></b> (bacilos gram-negativos)</p>	<p><b><i>Bacillus spp.</i></b> (bacilos gram-positivos)</p>	<p><b><i>Staphylococcus spp.</i></b> (cocos gram-positivos agrupados em cachos)</p>	<p><b><i>Streptococcus spp.</i></b> (cocos gram-positivos agrupados em cadeias)</p>

3. Comente a importância da coloração do Gram para o Fisioterapeuta.

# ROTEIRO PRÁTICO DE MICOLOGIA

## PROF. Dr. CARLOS P. TABORDA

### AULA PRÁTICA Nº 2

## INTRODUÇÃO À MICOLOGIA MÉDICA - MORFOLOGIA, REPRODUÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DOS FUNGOS

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 (bolors) e cremosas (leveduras) e com os mais diversos tipos de pigmentos.

A unidade estrutural dos fungos filamentosos 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 em reprodutivo que serve à reprodução dos fungos. O micélio vegetativo também pode se reproduzir.

De acordo com a morfologia, os fungos podem apresentar 3 tipos:

**Unicelular:** Células arredondadas, ovóides ou alongadas, podendo se reproduzir por brotamento, cissiparidade ou por outro processo. Caracteriza as leveduras.<sup>[1]</sup>

**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 bolors.

**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*.

O micélio vegetativo (em fungos filamentosos) se diferencia em estruturas de reprodução caracterizadas pela formação de conídios/espores que cumprem as funções de disseminação da espécie. Os conídios/espores podem ser hialinos, pigmentados, simples, septados, apresentando várias formas que muitas vezes definem gêneros ou espécies de fungos.

São estruturas extremamente importantes na identificação dos fungos. As estruturas reprodutivas, de acordo com sua origem, podem ser assexuadas (conídios) ou sexuadas (espores) e tanto um com outro, podem estar ou não dentro de determinadas estruturas.

Conídios (Reprodução assexuada):<sup>[1]</sup>Ectósporos: formam-se na extremidade de hifas especiais denominadas conidióforos. Ex. *Aspergillus*, *Penicillium*.<sup>[1]</sup>Endósporos: conídios produzidos no interior de esporângios. Os conídios, nesse caso são chamados de esporangiósporos e caracterizam a subdivisão Zygomycotina. Ex. *Rhizopus*, *Mucor*, *Absidia*.

Esporos (Reprodução sexuada): 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 e lâminas focalizadas de *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Candida* sp.

**DEMONSTRAÇÃO DE CULTURAS FÚNGICAS E LÂMINAS: MORFOLOGIA MACROSCÓPICA**

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

**-MORFOLOGIA MICROSCÓPICA**

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

<b>MORFOLOGIA MACROSCÓPICA</b> <b>Descrição dos aspectos macroscópicos</b>	<b>MORFOLOGIA MICROSCÓPICA</b> <b>Descrição e desenho dos aspectos microscópicos</b>
<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.
<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.
<i>Rhizopus</i> sp.	<i>Rhizopus</i> sp.
<i>Candida albicans</i> – vida saprofítica	<i>Candida albicans</i>

**Conclusão:**

---

---

---

---

## **ECOLOGIA E FIOLOGIA DE FUNGOS**

### **ECOLOGIA DOS FUNGOS**

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 conídios/ 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 ágar Sabouraud para isolamento de fungos anemófilos; Tubos com 1 g de milho moído; tubos com 1 g de solo e tubos com água do lago e água do abastecimento public.

### **PRÁTICA**

#### **ISOLAMENTO DE FUNGOS ANEMÓFILOS**

Expor placas de Petri, contendo ágar Sabouraud dextrose durante 15 minutos em diferentes locais. Cultivar à 25 °C. Após 7 dias realizar a contagem de colônias crescidas – diferenciar em fungos filamentosos e leveduras

**ISOLAMENTO DE FUNGOS DE SUBSTRATOS (alimentos e solo).**<sup>[1]</sup><sub>[SEP]</sub>Fazer uma suspensão do substrato (1 g) em 9 mL água destilada estéril. Semear **0,1 ml** do líquido na superfície do ágar Sabouraud dextrose. Espalhar com alça de Drygalsky e cultivar à 25 °C. Após 7 dias realizar a contagem de colônias crescidas e iniciar a identificação das mesmas.

#### **ISOLAMENTO DE FUNGOS DE SUPERFÍCIE**

Com auxílio de “swab”, umedecer o algodão em água destilada estéril e retirar o excesso na

parede do tubo. Passar o “swab” na área de interesse e semear na superfície do ágar Sabouraud dextrose. Após 7 dias realizar a contagem de colônias crescidas – diferenciar em fungos filamentosos e leveduras.

### **ISOLAMENTO DE FUNGOS DE LÍQUIDOS (água do lago e de abastecimento público).**

Para o isolamento de fungos que utilizam a água como via de dispersão, utiliza-se técnicas de diluição comuns e semeadura na superfície em ágar Sabouraud.

Coletar água do bebedouro, da torneira ou de outro local. Semear **0,1 ml** do líquido na superfície do ágar Sabouraud dextrose. Espalhar com alça de Drygalsky e cultivar à 25 °C. Após 7 dias realizar a contagem de colônias crescidas e iniciar a identificação das mesmas.

### **LEITURA**

Após a incubação por 7 dias, dos meios de cultura, observar e distinguir o tipo de crescimento fúngico (levedura ou bolor) e contar o número de colônia para cada tipo fúngico. Inserir os resultados de contagem de colônias e os aspectos macroscópicos (após 7 dias).

	<b>Leveduras</b>	<b>Bolor</b>
<b>Fungos Anemófilos</b>		
<b>Solo</b>		
<b>Alimento (milho)</b>		
<b>Água do Lago</b>		
<b>Água do Abastecimento Público</b>		
<b>Superfície de Material</b>		



**Conclusão:**

---

---

---

### AULA PRÁTICA Nº 3

#### FISIOLOGIA DE FUNGOS

Os fungos são seres heterotróficos retirando os nutrientes do meio ambiente circundante. Através de digestão enzimática externa transformam as substâncias de maneira que possam ser absorvidas. De maneira geral necessitam de 4 elementos básicos: H, O, C e N, além de outros elementos em menor quantidade: P, S, K, Mg, Fe, Zn, Mn, Cu, Mb, sendo que alguns fungos necessitam ainda de determinados fatores de crescimento, como por exemplo a tiamina. De maneira geral, para seu crescimento, necessitam de uma fonte orgânica de C e de uma orgânica ou inorgânica de N. O meio artificial básico para trabalho com fungos é ágar Sabouraud que tem como fonte de C, a glicose e como fonte de N, a peptona.

Um esporo/conídio de fungo, tendo os nutrientes adequados, germina, filamento, cresce e origina novos esporos/conídios. Nesse processo de crescimento, vários fatores interferem como temperatura, umidade, pH, etc. De maneira geral, o ótimo de temperatura é entre 20 °C e 30 °C, mas os fungos podem se manter em temperaturas baixas ou altas. Há fungos termofílicos, termotolerantes, mesofílicos, psicrófilos. A umidade ótima para seu crescimento é entre 75 e 95 %, mas também suportam uma ampla variação. Da mesma maneira acontece com o pH. As leveduras crescem em variações de pH entre 2,5 e 8,5 e os bolores entre 1,5 e 11. De maneira geral o ótimo é neutro.

Alguns fungos apresentam-se em determinadas condições, na forma filamentosa e em outras condições, na forma de levedura. Como exemplo desse dimorfismo, temos o *Paracoccidioides brasiliensis*, o *Histoplasma capsulatum* e o *Sporothrix schenckii*, importantes agentes de micoses, que na natureza ou em laboratório à temperatura de 25 °C, apresentam-se em forma de bolor e quando infectando um hospedeiro ou a 37 °C em laboratório, apresentam-se em forma de levedura.

As células fúngicas, para sobreviverem e reproduzirem, se nutrem por meio de absorção de diversos nutrientes, desde estruturas moleculares simples (metano) até as mais complexas (celulose, lignina). Para tais, os fungos disponibilizam de processos metabólitos, muitas vezes específicos do gênero/espécie. Essas reações químicas celulares podem ser utilizadas para a identificação de fungos, assim como as características macro e micromorfológicas (Método clássico de identificação de fungos).

As principais provas bioquímicas são:

**Auxanograma:** Avalia a capacidade de assimilação de carboidratos (fontes de carbono) pelos fungos (Respiração aeróbica) e assimilação de fontes de nitrogênio (orgânico ou inorgânico)

**Zimograma:** Avalia a capacidade de fermentação de carboidratos pelos fungos (Respiração anaeróbica), caracterizadas pela formação de gás no tubo de Durham.

**Urease:** Avalia a capacidade do fungo em converter a uréia em amônia e anidro carbônico. A amônia deixa o meio de cultura com pH básico. Como o indicador de pH é a vermelho de fenol, o meio ficará na coloração róseo-avermelhada.

### **Roteiro para Relatório das Práticas: Morfologia, Ecologia e Fisiologia de Fungos**

1. Introdução

2. Materiais e Métodos

3. Resultados e Discussão  
Além de descrever os resultados obtidos nos experimentos e nas demonstrações. Abordar os seguintes aspectos:

a. Qual a importância do controle de qualidade dos fungos do ar? b. Porque é importante conhecer os processos bioquímicos e fisiológicos dos fungos? c. Qual a relação da morfologia com o ambiente nutricional?

4. Referências

### **DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS MICOSES**

As doenças provocadas por fungos são classificadas de acordo com a localização no hospedeiro:

#### **Micoses superficiais**

Pitíriasis versicolor - *Malassezia furfur* Piedra preta - *Piedraia hortae* Piedra branca - *Trichosporon beigeli*

**Micoses Cutâneas** Dermatofitoses - *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*  
Candidíase - *Candida*

#### **Micoses Subcutâneas**

Esporotricose – *Sporothrix* Cromomicose - *Phialophora*, *Cladophialophora* e *Fonsecaea*  
Micetomas- *Pseudoallescheria*, *Madurella*, *Acremonium* Doença de Jorge Lobo - *Paracoccidioides loboii*

**Micoses Sistêmicas endêmicas** Paracoccidioidomicose - *Paracoccidioides* Histoplasmose - *Histoplasma capsulatum*

**Outras Micoses Sistêmicas** Candidíase – *Candida* Criptococose- *Cryptococcus* Aspergilose – *Aspergillus*

Além das micoses, os fungos podem ainda produzir alergias, micotoxicoses e micetismos.

## **Diagnóstico laboratorial Métodos diretos**

1- Exame direto a fresco - clareamento com KOH

após colorações: Gram, Giemsa

2- Histopatológico - HE, Gomory, PAS

3- Cultura: Sabouraud Sabouraud + antibióticos Meios específicos: seletivos e indicadores  
Exame macroscópico e microscópico

4- Provas bioquímicas p/ identificação Auxanograma para fontes de C e N.  
Zimograma Urease etc.

5- Provas imunológicas para identificação do agente

## **Métodos Indiretos**

1- Imunológicos Reação de Fixação do complemento,

Precipitação,

imunodifusão,

aglutinação, contraimuno eletroforese, imunofluorescência, intradermoreação, etc

## **MICOSES SUPERFICIAIS E CUTÂNEAS MICOSES SUPERFICIAIS**

Constituem um grupo de fungos que estão praticamente no limiar do saprofitismo e do parasitismo, causando no hospedeiro apenas distúrbios estéticos.

### **PITÍRIASIS 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* spp.

**Características clínicas:** Lesões superficiais, atingindo principalmente o tronco e abdômen, mas podendo acometer pescoço, face, braços, e raramente mão e região inguino crural. 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 em hidróxido de potássio 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.

A cultura das escamas deve ser feitas em meio da Sabouraud dextrose + cloranfenicol + cicloheximida, adicionado de óleo de oliva e bile de boi, pois esta levedura é lipofílica, e incubada à 37°C.

## **PIEDRAS<sup>[1][7]</sup>PIEDRA BRANCA E PIEDRA NEGRA**

**Definição:** infecção micótica dos pelos caracterizada pela presença de nódulos mais ou menos duros, esbranquiçados (pedra branca) ou negros (pedra negra).<sup>[1][7]</sup>As pedras são infecções benignas, mas muito contagiosas e de fácil propagação. Ambas são distintas, não só pelos seus agentes etiológicos, mas também por sua distribuição geográfica e epidemiológica. Clinicamente, estas micoses podem ser confundidas com a tricomicose axilar e com a pediculose (lêndias). Atacam a região folicular dos pelos.

### **PIEDRA NEGRA**

**Agente etiológico:** *Piedraia hortae*

**Epidemiologia:** é observada em regiões tropicais e subtropicais da América do Sul, endêmica na Amazônia, na Indochina e em Java. Ocorre, principalmente nas regiões onde há abundante queda pluviométrica. Ataca somente os pelos do couro cabeludo, apresentando nódulos visíveis ou não a olho nu. As nodosidades da pedra preta são muito consistentes.

**Exame micológico:** o cabelo deve ser cortado e examinado após clarificação com potassa a 20%. Observa-se um nódulo constituído de um micélio largo de 2 a 4  $\mu$ m, de paredes escuras, presença de ascos ovais contendo ascóporos fusiformes.

**Cultura** em ágar-Sabouraud as colônias são verde-escuras, enegrecidas, acuminadas listas ou plissadas, de crescimento lento.

**Aspecto microscópico:** filamentos escuros, curtos de paredes espessas, numerosos clamidoconídios. **PIEDRA BRANCA<sup>[1][7]</sup>Agente etiológico:** *Trichosporon beigelli*

**Epidemiologia:** é de distribuição geográfica cosmopolita. Ataca os pelos da barba e do bigode, mais raramente os pelos axilares. Recentemente observou-se ser comum em pelos escrotais. Os nódulos são menos consistentes e aderentes ao pêlo. São frequentemente encontrados na extremidade do pelo e pouco visíveis a olho nu.

**Exame micológico:** Após clarificação de pêlo com potassa a 20%, observa-se micélio fragmentado em elementos mais ou menos retangulares ou arredondados. Não apresentam ascos.

**Cultura.** Em ágar Sabouraud dextrose, as colônias são de cor creme, moles, membranosas, tornando-se com o tempo levemente penugentas e aderindo fortemente ao meio de cultura. Crescimento rápido.

**Aspecto microscópico:** Filamentos e artroconídios.

## MICOSES CUTÂNEAS

### 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 nos seguintes gêneros:

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

Quanto ao habitat os dermatófitos podem ser: **geofílicos** - quando têm seu habitat no solo. **zoofílicos** - quando têm seu habitat nos animais. **antropofílicos** - quando têm seu habitat no homem.

**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 se tornam descoloridos, frágeis, e caem aparecendo uma zona de tonsura (tinhas tonsurantes)

O aspecto dos elementos fúngicos dentro e no redor dos pelos e a presença de hifas septadas, ramificadas, com artroconídios 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 = *tineacruris*; no corpo = *tineacorporis*; na barba = *tineabarbae*; na mãos = *tineamanum*; nos pés = *tineapedis*, na unha = *tineaunguium*; no couro cabeludo = *tineacapitis*.

**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 unha 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 oníquiassub-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 devem misturar materiais de locais diferentes.

**Diagnóstico Laboratorial** <sup>[L]</sup><sub>[SEP]</sub> **Material Biológico:** escamas de pele, raspado de unha e pelos

**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:** <sup>[L]</sup><sub>[SEP]</sub> No exame direto de escamas de pele ou unha observam-se filamentos micelianos longos, ramificados, septados, algumas vezes com arthroconídios <sup>[L]</sup><sub>[SEP]</sub> 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).

## PRÁTICA – micoses superficiais e cutâneas

**I - Lâminas focalizadas/Pranchas e Culturas** – Desenhar e fazer anotações a respeito das características macroscópicas e microscópicas.

Microsporia	Tricoficia
<i>Microsporum canis</i>	<i>Tricophyton rubrum</i>
<i>Microsporum gypsum</i>	<i>Tricophyton mentagrophytes</i>
Pele (+)	<i>Malassezia furfur</i>

## MICOSES SUBCUTÂNEAS

### ESPOROTRICOSE

#### Definição

Espécies do gênero *Sporothrix* são fungos dimórficos e agentes da esporotricose, micose subcutânea sub-aguda ou crônica, podendo ter 3 principais formas clínicas: cutânea, linfocutânea e disseminada, sendo a linfocutânea a mais freqüente. A infecção é adquirida através da inoculação traumática do fungo no tecido epitelial atingindo a camada subcutânea. Indivíduos que trabalham na lavoura, jardinagem e outros podem se contaminar com o fungo presente no ambiente por meio de farpas de madeiras e espinhos de plantas. Atualmente, a transmissão zoonótica da esporotricose está vinculadas a arranhaduras e mordidas de felinos infectadas por *Sporothrix* e está intimamente ligada a epidemia de esporotricose no estado do Rio de Janeiro desde 1998. As principais espécies causadoras da esporotricose são: *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. mexicana*, *S. globosa*, *S. palida*.

O exame direto à fresco não apresenta muito valor no diagnóstico desta micose, pois as



estruturas fúngicas não revela características diferenciais em vida parasitária. Em material de biópsia observam-se leveduras em forma de “naveta”.

O cultivo deve ser realizado à 25°C e à 37°C. À 25°C a cultura encontra-se em fase M (bolor) 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 dos pedúnculos (conidióforos) ou inseridos diretamente nas hifas. Culturas envelhecidas revelam conídios arredondados e dispostos paralelamente às hifas. À 37°C, a cultura está em fase Y (levedura) e observa-se o desenvolvimento de uma colônia branca e cremosa. Ao exame microscópico observam-se leveduras globosa a elípticas ou em forma de naveta.

### **Diagnóstico laboratorial**

**Material Clínico:** pele, punção dos linfonodos, pus, sangue, biópsias de tecidos etc.<sup>[1]</sup>**Exame direto:** à fresco não revela nenhuma forma conclusiva de *Sporothrix*. 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, Gram +, PAS +, tamanho de 2-3 μ x 3 μ, 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.<sup>[1]</sup>**Cultura:** excelente crescimento em ágar Sabouraud dextrose ou Mycosel. Cultura cresce em 3 a 5 dias, é um processo seguro e de rápido diagnóstico.

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.

## **CROMOMICOSE**

### **Definição**

É uma infecção crônica de evolução lenta, que acomete a pele e o tecido celular subcutâneo do homem e dos animais. A maioria das lesões é causada por fungos da família Dematiaceae, que vivem no solo e vegetais em decomposição. O aspecto clínico das lesões é polimorfo, caracterizando principalmente pela formação de nódulos, lesões papulosas, eritemato-descamativas e pela forma clássica, verrucosa, que pode apresentar-se ulcerada ou não. Normalmente, as lesões localizam-se nos membros inferiores, principalmente nos pés e pernas.

A infecção ocorre geralmente pela inoculação traumática das partículas fúngicas na pele do hospedeiro. E os principais agentes etiológicos da cromomicose são: *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea compacta*, *Phialophora verrucosa*, *Cladosporium carrionii* e *Rinocladiella aquaspersa*. É importante ressaltar que no tecido do hospedeiro, as partículas fúngicas inoculadas se convertem em células globosas, com presença de fissão entre as células e com coloração natural marrom, chamadas de corpos fumagóides, células muriformes ou células escleróticas. Essas células são consideradas leveduras e se dividem por meio de fissão binária. A observação dessas estruturas é sugestiva de cromomicose, eliminando outras doenças como leishmaniose e esporotricose. Tanto as células escleróticas e o micélio dos fungos causadores da cromomicose (fungos demáceos) possuem coloração natural marrom-castanho.

### **Diagnóstico laboratorial**

**Material Biológico:** secreções, escamas de pele, biópsias de tecido. **Exame Direto:** Clarificação com KOH 10%. Observação de células globosas, ovaladas, de parede espessa, de coloração castanha, apresentando geralmente septação interna chamadas de corpos fumagóides, células muriformes ou células escleróticas. A presença dessas células é sugestivo de cromomicose. **Cultura:** Cultivar em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol ou Mycosel (ágar peptonado e glicosado com cicloheximida e cloranfenicol) a 25-30°C. Um fato peculiar é que os fungos causadores da cromomicose não crescem na presença de cicloheximida. **Histopatologia:** Os cortes histológicos podem ser corados com HE. Observação as células escleróticas de coloração natural marrom.

## PRÁTICA

### II - Observe as culturas e lâminas focalizadas.

#### Desenhe e descreva as características macroscópicas e microscópicas:

<i>Histoplasma</i> sp	<i>Candida</i> sp
<i>Cryptococcus</i> sp	<i>Sporothrix</i> sp
<i>Paracoccidioides</i> sp.	

## MICOSES SISTÊMICAS I - Candidíase e Criptococose

### CANDIDÍASE

#### Definição

Candidíase é uma infecção primária ou secundária envolvendo as espécies do gênero *Candida*. Pode-se considerar cerca de 7 espécies mais frequentes em material clínico humano: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. stellatoidea*, sendo a espécie de *C. albicans* a mais freqüente. Entretanto, espécies resistentes aos antifúngicos são emergindo como *C. auris* e *C. lusitaniae*. 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. No caso de infecções sistêmicas, a mortalidade pode chegar até 70% dos casos de candidemia.

Os processos patológicos também são variados indo desde irritação e inflamação até uma resposta granulomatosa e supurativa. Espécies de *Candida* são leveduras que fazem parte da microbiota, isto é, encontradas normalmente no homem e sua manifestação representa um processo oportunístico.<sup>[1]</sup> Para que *C. albicans* seja considerada patogênica é necessário que

seja isolada de modo constante, em grande quantidade das lesões e, de modo geral, visualizada ao exame direto na forma filamentosa. Frequentemente, o paciente apresenta debilitação em seus mecanismos de defesa ou tem uma doença de base. Nos pacientes idosos debilitados, recém-nascidos prematuros e nos desnutridos, a ocorrência de candidíase é alta, em suas variadas formas clínicas. Durante a gravidez, principalmente nos 3 últimos meses, com o aumento de glicogênio nas células da mucosa vaginal, e uso de anticoncepcionais de alta dosagem ocorre aumento de candidíase vaginal. Tratamentos prolongados com antibióticos, principalmente os chamados de largo espectro de ação, corticóides, drogas imunossupressoras favorecem a instalação de candidíases, principalmente as formas invasivas.

**Diagnóstico Laboratorial** <sup>[1]</sup><sub>[SEP]</sub> **Materiais biológicos:** 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% <sup>[1]</sup><sub>[SEP]</sub>
- esfregaços corados pelo Gram ou Giemsa (além de poder visualizar os elementos fúngicos, permite avaliar a quantidade de microrganismos) <sup>[1]</sup><sub>[SEP]</sub>
- cortes histológicos: PAS ou Gomori & Grocott (elementos leveduriformes com brotamentos e filamentos abundantes).

<sup>[1]</sup><sub>[SEP]</sub> **Cultura:** em meio ágar Sabouraud dextrose + cloranfenicol; após 24-48 horas colônias cremosas, esbranquiçadas, brilhantes. Ao exame microscópico visualizam-se apenas os elementos leveduriformes comuns a todas as espécies de *Candida*.

**Identificação da espécie de *Candida***

1. Produção de clamidioconídios: em meio de fubá (“cornmeal ágar”+ tween 80), a *C. albicans* produz clamidioconídios terminais ou intercalares, redondos ou ovais, após 24-48 h. <sup>[1]</sup><sub>[SEP]</sub>
2. Produção de tubo germinativo: a espécie de *C. albicans* produz o tubo germinativo em presença de soro (humano, fetal bovino) após 1-3 horas à 37°C.
3. Auxanograma: Assimilação de fontes de carbono e nitrogênio. 4. Zimograma: Fermentação de açúcares.

**CRIPTOCOCOSE**

**Definição**

É uma infecção subaguda ou crônica de comprometimento pulmonar, sistêmico e, principalmente, do sistema nervoso central (SNC), causada pelo *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. 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. A espécie de *C. gattii*, também, pode causar criptococose em pacientes imunocompetentes.

*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. Já *C. gattii* é frequentemente isolado de troncos de eucaliptos e está relacionado com a presença de madeira em decomposição.

**Diagnóstico Laboratorial:** <sup>[1]</sup>**Materiais biológicos:** liquor, escarro, pus ganglionar, exsudatos de lesões cutâneas e mucosas, urina e

sangue.

**Exame direto:** à fresco com tinta nanquim as leveduras de *Cryptococcus* spp. são visualizadas como células redondas, circundadas por uma cápsula mucopolissacarídica não corada.

**Histopatologia:** Coloração com H&E, Gomori-Grocott – presença de leveduras; Coloração de mucicarmim evidencia a presença de cápsula polissacarídica envolvendo a levedura – se colora em rosa.

**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.

## MICOSES SISTÊMICAS II - Paracoccidiodomicose e Histoplasmose

### PARACOCCIDIOIDOMICOSE (PCM) Definição

*P. brasiliensis* e *P. lutzii* são fungos dimórficos e agentes etiológicos da PCM, doença de localização sistêmica, grave e que se manifesta por diversas formas clínicas.<sup>[1]</sup> 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 dextrose a 25 °C e em ágar BHI com sangue ou meio de Fava Netto a 37 °C e incubar de 20 a 30 dias. A 25 °C, a cultura esta 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.

### **Diagnóstico Laboratorial**

**Material Biológico:** escarro, secreções, pus de linfonodos, material de lesões cutâneas, mucosas, sangue.<sup>[1]</sup>  
**Exame Direto:** Clarificação com KOH 10%. Observação de formas de leveduras com múltiplos brotamentos com forma de roda de Leme. A presença desta estrutura fúngica é sugestiva de *Paracoccidioides* spp.

**Cultura:** Cultivar em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol ou Mycosel (ágar peptonado e glicosado com cicloheximida e cloranfenicol) em temperaturas inferiores a 29°C para obtenção da forma filamentosa. A conversão para a forma levedura, faz-se o cultivo em meio ágar cérebro-fígado- coração (BHI) a 37°C. A confirmação do dimorfismo fúngico é necessária para fechar o diagnóstico. **Histopatologia:** Os cortes histológicos podem ser corados com H&E ou Gromori-Grocott. A última coloração evidencia a presença de fungo no tecido apresentando leveduras multibrotantes. O fungo aparece com coloração marron-negro no fundo claro.

**Teste Sorológico:** Consiste na pesquisa de anticorpos anti-*Paracoccidioides* (Anticorpo anti-gp43). Pode-se utilizar diversas técnicas: Imunodifusão em gel duplo, Fixação do complemento, Western blot, Aglutinação em látex

## **HISTOPLASMOSE**

### **Definição**

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.<sup>[1]</sup> *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, com o crescimento de leveduras nos alvéolos pulmonares e interstício. A intensidade da exposição inalatória, além de outros fatores, determinará se a infecção resultante corresponderá a sintomas clínicos. Se a exposição for leve, a infecção será provavelmente assintomática, e se for maciça, o resultado será sintomática aguda.

### **Diagnóstico laboratorial**

**Material Biológico:** Escarro, material de biópsia, sangue. **Exame direto:** o exame à 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 **estalagnósporos**. 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.

## **AULA PRÁTICA Nº 4**

### **ANTIFUNGIGRAMA**

Infecções causadas por fungos têm se tornado um grande problema de saúde pública e vêm crescendo em número e gravidade nas últimas três décadas. Esse aumento progressivo está relacionado com a evolução dos procedimentos médico-hospitalares invasivos, aumentando o risco de infecção fúngica, principalmente, em pacientes internados em unidades de oncologia, hematologia e de terapia intensiva (UTIs). Atualmente, a terapia antifúngica está restrita aos agentes poliênicos, aos azóis, as alilaminas, aos derivados morfolínicos, análogos de pirimidinas (5-fluorocitosina), a griseofulvina e, mais recentemente, as equinocandinas. No entanto, para o tratamento das micoses invasivas, este arsenal terapêutico é limitado por problemas de baixa seletividade, alta toxicidade e aumento de fungos resistentes aos antifúngicos.

O teste de susceptibilidade “in vitro” tem o objetivo de avaliar se o fungo filamentosos ou levedura é sensível ou resistente a um antifúngico. Embora este não seja um teste rotineiramente empregado na clínica médica, o ideal é a realização deste teste para melhor direcionar a escolha do tratamento antifúngico. Alguns casos refratários ao tratamento justificam teste de susceptibilidade aos antifúngicos. As cepas isoladas são testadas utilizando técnicas padronizadas contra os antifúngicos utilizados na clínica, principalmente no ambiente hospitalar (anfotericina B, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, isavuconazol, caspofungina, micafungina e anidulafungina).

A padronização destes testes de susceptibilidade aos antimicrobianos é realizada por órgãos internacionais como o CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, USA) e o EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Europa). No Brasil, o Comitê Brasileiro para Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (BrCAST) tem padronizado os ensaios de acordo com a realidade brasileira. Para os testes de sensibilidade aos antifúngicos é preconizado o uso dos protocolos BrCAST - EUCAST que estão disponíveis em português no site: [www.brcast.org.br](http://www.brcast.org.br). Esses protocolos bem como os critérios de interpretação tem sido atualizados de tempos em tempos. Esta padronização é necessária para que estudos epidemiológicos possam ser realizados em diferentes partes do mundo e os resultados comparados. Além disso, para a pesquisa de novos agentes antifúngicos, um dos quesitos é comparar a eficácia das novas moléculas com os antifúngicos padrão. Para uma boa execução do ensaio, é necessário realizar o controle de qualidade do teste, pois é essencial para assegurar os resultados obtidos. Para isso é recomendado que se use uma cepa padrão (geneticamente estável) para determinar valores aceitáveis de concentração inibitória mínima (CIM) para a tal cepa. Em geral, os resultados obtidos com variação de CIM  $\pm$  uma diluição podem ser aceitos.



## Definições

**CIM** – Concentração inibitória mínima: é a menor concentração do antifúngico capaz de inibir o crescimento do fungo

**TÉCNICA DE MACRODILUIÇÃO EM CALDO** – Testes de Susceptibilidade de fungos aos antifúngicos padrão

## Materiais

Suspensão de leveduras de *Candida* sp. ( $5 \times 10^6$  leveduras/mL). Solução estoque de Anfotericina B (160 µg/mL) Solução estoque de Fluconazol (160 µg/mL) Tubos com 0,9 mL de caldo Sabouraud

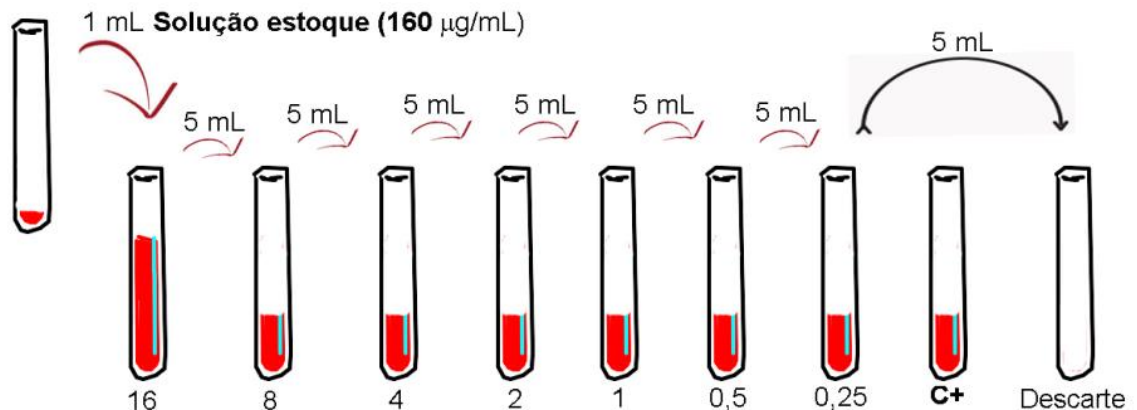
Tubos com 0,5 mL de caldo Sabouraud

**Concentrações a serem testadas:** Anfotericina B: 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 e 0,25 µg/mL  
Fluconazol: 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 e 0,25 µg/mL  
Controle positivo: crescimento de fungo  
Controle negativo: ausência de crescimento de fungo

## Procedimento:

Em série de 8 tubos de meio de cultura (1o tubo: 0,9 mL e os demais 0,5 mL) Proceder da seguinte maneira:

1. colocar 0,1mL de antifúngico (solução estoque de 160 µg/mL) no primeiro tubo (**Tubo 16**) com meio de cultura (diluição 1:10) e homogeneizar.
2. Proceder a diluição seriada de 1:2, transferindo 0,5mL do **tubo 16 para o tubo 8** e homogeneizá-lo.
3. Realizar o procedimento 2 até o **tubo 0,25**.
4. Após homogeneização do tubo 0,25, descartar os 0,5mL no **Tubo Descarte**.



5. O penúltimo tubo conterá somente o meio de cultura para o controle positivo de

crescimento fúngico(C+),e o último tubo conterá somente o meio de cultura (C-) [L]<sub>[SEP]</sub>

6. Após a diluição do antifúngico, transferir **10 µL** da suspensão de fungo em **todos** os tubos, EXCETO no C-. [L]<sub>[SEP]</sub>

7. Incubar a série de tubos a 35oC por 24 h para *Candida* spp. [L]<sub>[SEP]</sub>

8. Determinar o valor de CIM para cada antifúngico por meio de Leitura Visual

**RESULTADOS - Macrodiluição em caldo**[L]<sub>[SEP]</sub>**Para a interpretação dos resultados usar a**

**Tabela 1.** Diretrizes de interpretação dos testes de susceptibilidade “in vitro” de *Candida* spp. aos antifúngicos (Adaptado do BrCAST, 2022).

Antifúngicos	Ponto de Corte para CIM (mg/L)									
	<i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. tropicalis</i>	
	S≤	R>	S≤	R>	S≤	R>	S≤	R>	S≤	R>
<b>Anfotericina B</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Fluconazol</b>	2	4	0,002	32	-	-	2	4	2	4
<b>Micafungina</b>	0,016	0,016	0,032	0,032	IE <sup>4</sup>	IE <sup>4</sup>	0,002	2	IE <sup>4</sup>	IE <sup>4</sup>
<b>Voriconazol<sup>6</sup></b>	0,064 <sup>5</sup>	0,25 <sup>5</sup>	IE	IE	IE	IE	0,125 <sup>5</sup>	0,25 <sup>5</sup>	0,125 <sup>5</sup>	0,25 <sup>5</sup>

*C. krusei*tem resistência intrínseca ao fluconazol. **Experimento 1:**

**Valor de CIM = \_\_\_\_\_ µg/mL**

**Interpretação: \_\_\_\_\_**

-

Valor de CIM = \_\_\_\_\_ µg/mL

Interpretação: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

### Roteiro para o Relatório:

1. Introdução 2. Materiais e Métodos 3. Resultados e Discussão 4. Referências

<b>Fungo:</b>	<b>Antifúngico:</b>							
Concentração do antifúngico (µg/mL)	16	8	4	2	1	0,5	0,25	C+
Crescimento do fungo (+: crescimento; inibição de crescimento)								
<b>Fungo:</b>	<b>Antifúngico:</b>							
Concentração do antifúngico (µg/mL)	16	8	4	2	1	0,5	0,25	C+
Crescimento do fungo (+: crescimento; inibição de crescimento)								

## TÉCNICA DIFUSÃO EM ÁGAR

### Atividade antifúngica de produtos naturais

Materiais

Suspensão de leveduras de *Candidasp*

Pedaço de alho

Cravo da Índia

Eugenol

Discos de papel filtro

Placas de Agar Sabouraud Glicose

## AULA PRÁTICA Nº 5A

### **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, contêm 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.

## **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 multiplicar-se-ão produzindo milhões de descendentes que formarão unidades macroscopicamente visíveis, denominadas **colônias**.

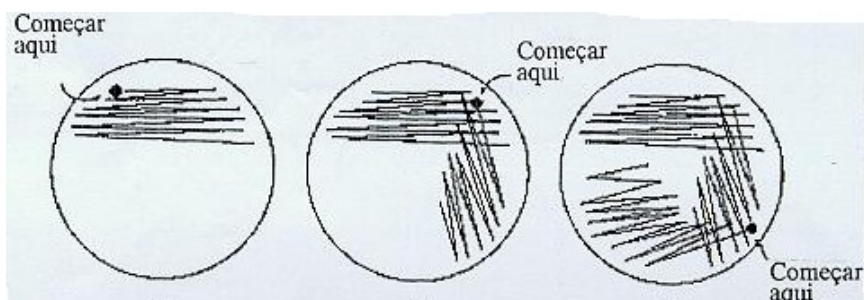
O material que contém os microrganismos que serão semeados recebe o nome de **inóculo** e este procedimento é realizado utilizando-se uma **alça de cultivo** ou uma pipeta.

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 DESENVOLVIMENTO BACTERIANO

Os meios de cultura semeados são incubados a uma temperatura e requerimentos de  $\text{O}_2$  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 ( $< 0,5 \text{ mm}$ );
- 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) Mamelonada (forma de “mamilo”);
- e) 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:

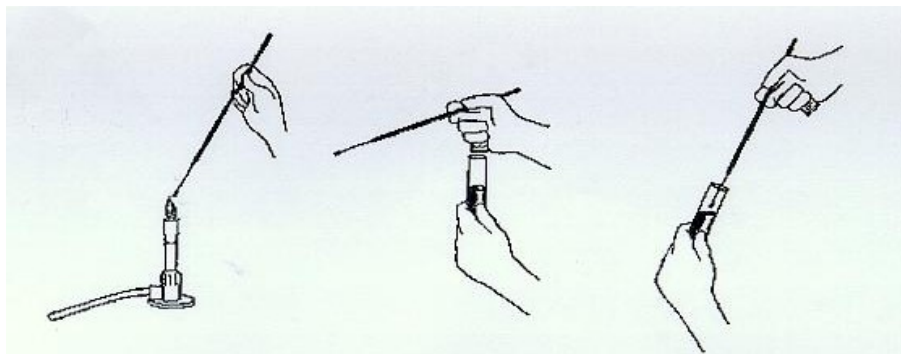
Quando se semeia em ágar-sangue, as bactérias podem destruir os glóbulos vermelhos produzindo hemólise. Segundo esta característica, as bactérias podem ser:

- 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.

#### **Material:**

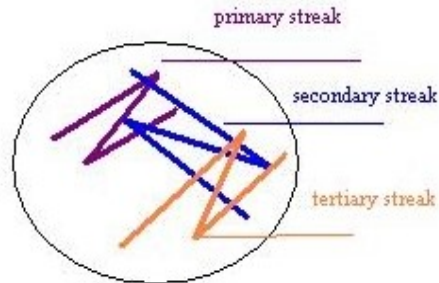
- 1 – Meio de transporte contendo swab estéril;
- 2 - Placa de Petri contendo meio de cultura sólido (ágar nutriente) estéril;
- 3 – Alça bacteriológica;
- 4 – Lâminas de vidro;
- 5 - Bateria de corantes da Coloração de Gram
- 6 – cotonete (*swab*) estéril
- 7 – Tubo com solução salina estéril
- 8 - Microscópio

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

a) Depositar a amostra contida no meio de transporte na superfície de uma placa de ágar nutriente;

b) Flambar a alça;

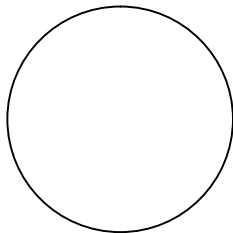
c) **Semear por esgotamento:** a partir de um ponto de inoculação, distribuir o material na placa, fazendo “estrias ou zig-zag” no restante da placa. Este procedimento “separa/espalha” bactérias e, quando crescem, produzem colônias isoladas.



j) Incubar a placa de ágar nutriente e o tubo com caldo nutriente a 37°C por 24 horas;

f) **Fixar a amostra em uma lâmina de vidro e realizar a coloração de Gram;**

h) **Desenhar a morfologia microscópica e coloração de Gram das bactérias observadas diretamente nas amostras;**



**Morfologia:**

**Gram:**

## **Procedimento 2: 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.**

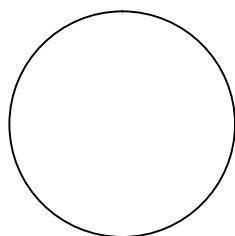
**Leitura da aula prática anterior com Coloração de Gram das colônias**

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:

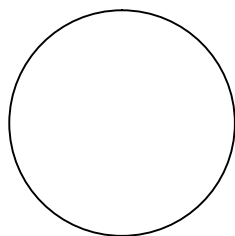


**Morfologia microscópica:**

**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 RELATÓRIO**

- 1. A amostra foi semeada em Meio líquido (caldo) e meio sólido (em placas de Petri). Quais as vantagens que oferecem estes dois tipos de cultivos?**
- 2. A morfologia microscópica e coloração de Gram feita diretamente da amostra, são a mesma que das colônias isoladas em meio sólido?**
- 3. É normal a presença de bactérias em partes do corpo humano como a mão?**
- 4. No caso que um Fisioterapeuta realize um procedimento em um paciente com fratura exposta, existe a probabilidade de que a bactéria da mão produza uma infecção neste paciente? Como poderia evitar a infecção?**

## **AULA PRÁTICA Nº 5B**

### **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:**

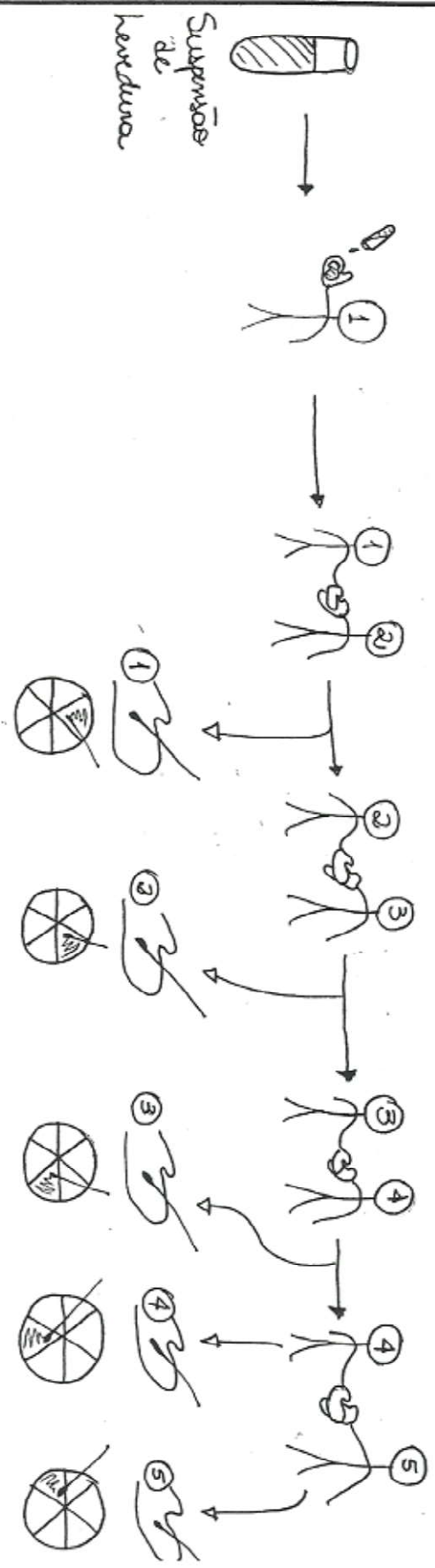
Um aluno de cada grupo irá umedecer o “swab” em solução salina estéril e encostará este na maçaneta da porta do laboratório para posteriormente inocular uma placa estéril de ágar nutriente para obter cultura pura por esgotamento.

**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 paciente? 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)?**

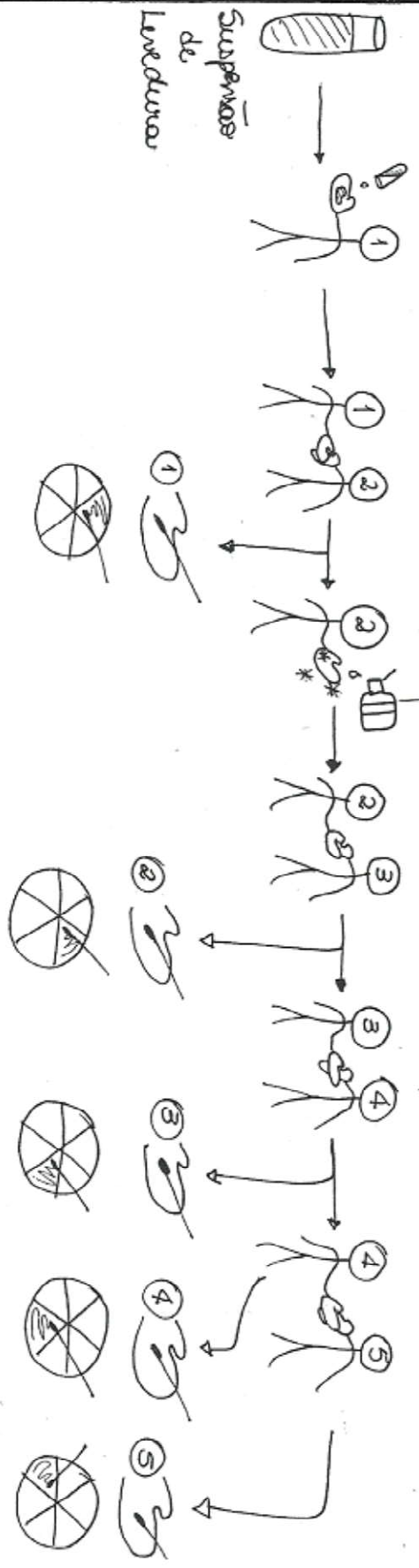
# Atividade A - Contaminação Direta

## A1. Experiência Controlada



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

## A2. Experiência Teste



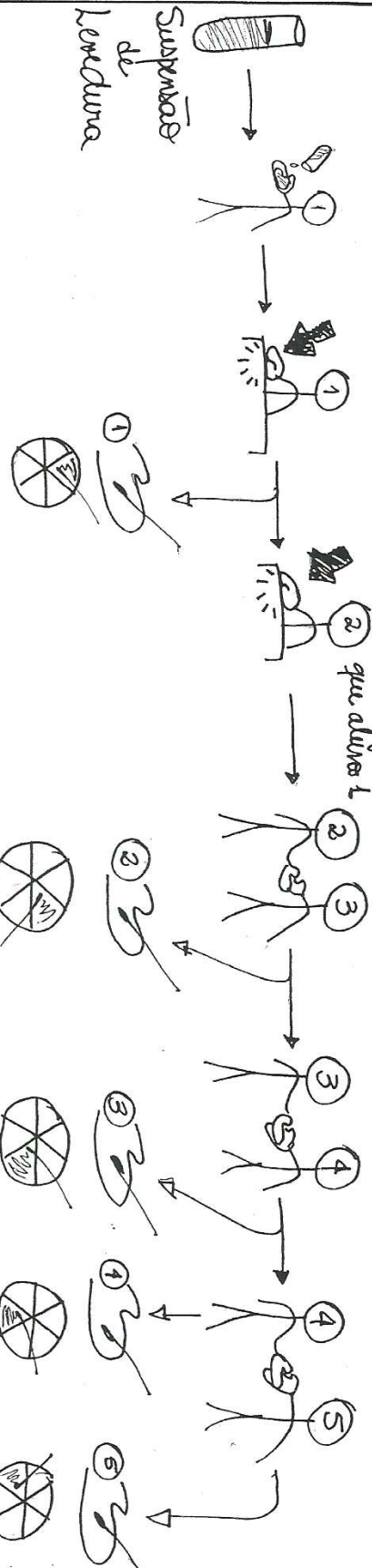
**TODOS: LAVAR AS MÃOS!!**

Gustavo Henrique

# Atividade B - Contaminações Indiretas

B1. Experiência Controlada

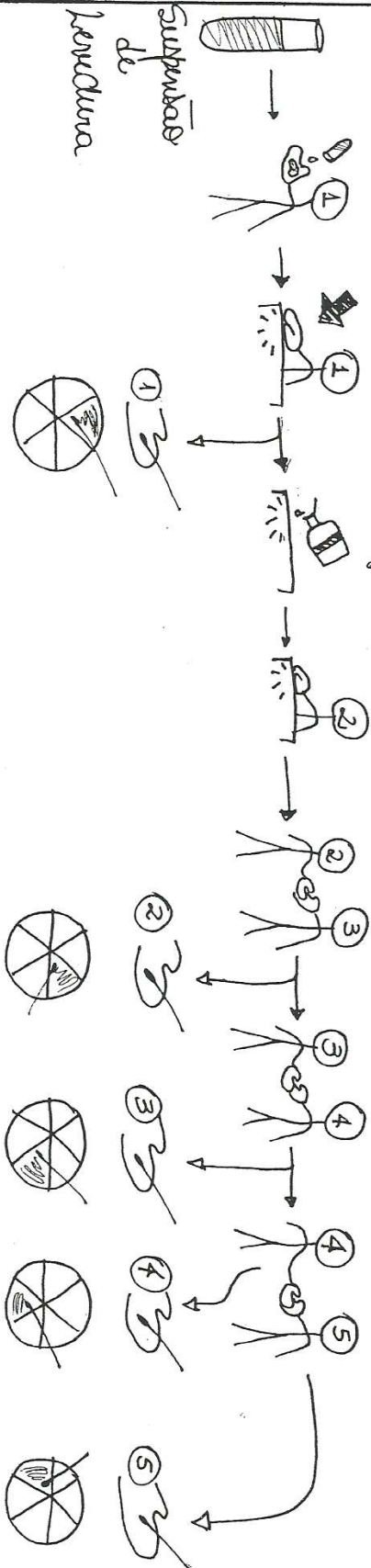
Aluno 2 libera a mão no mesmo lugar, Aluno 1



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

B2. Experiência Teste

Limpa a superfície com agente oxidante



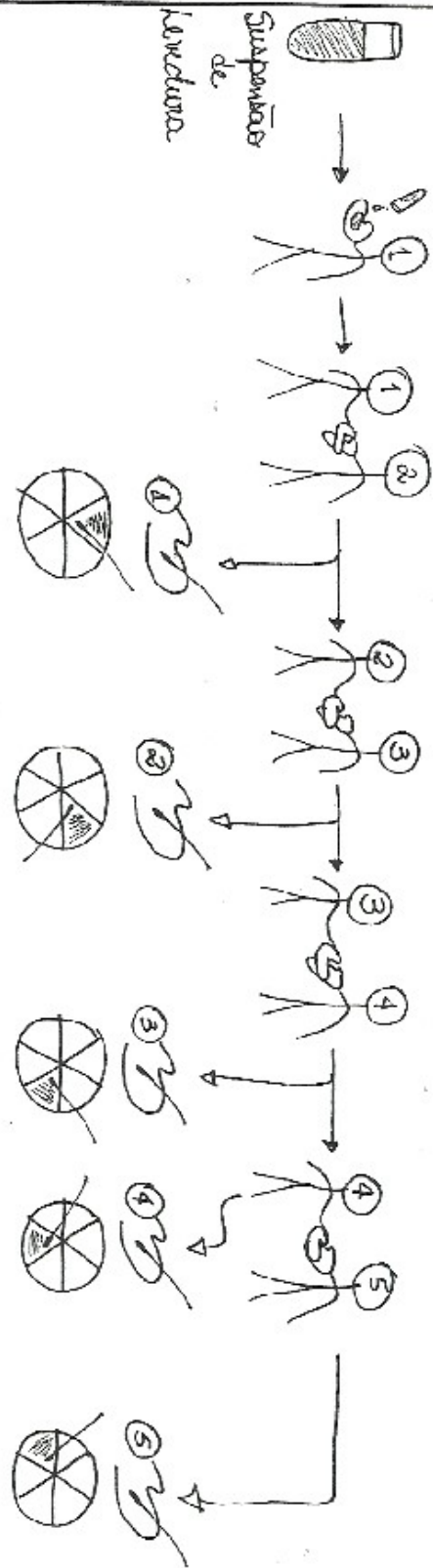
**TODOS: LAVAR AS MÃOS**

Cristiana Ferreira



# Atividade C - Contaminação direta com remoção mecânica pela água

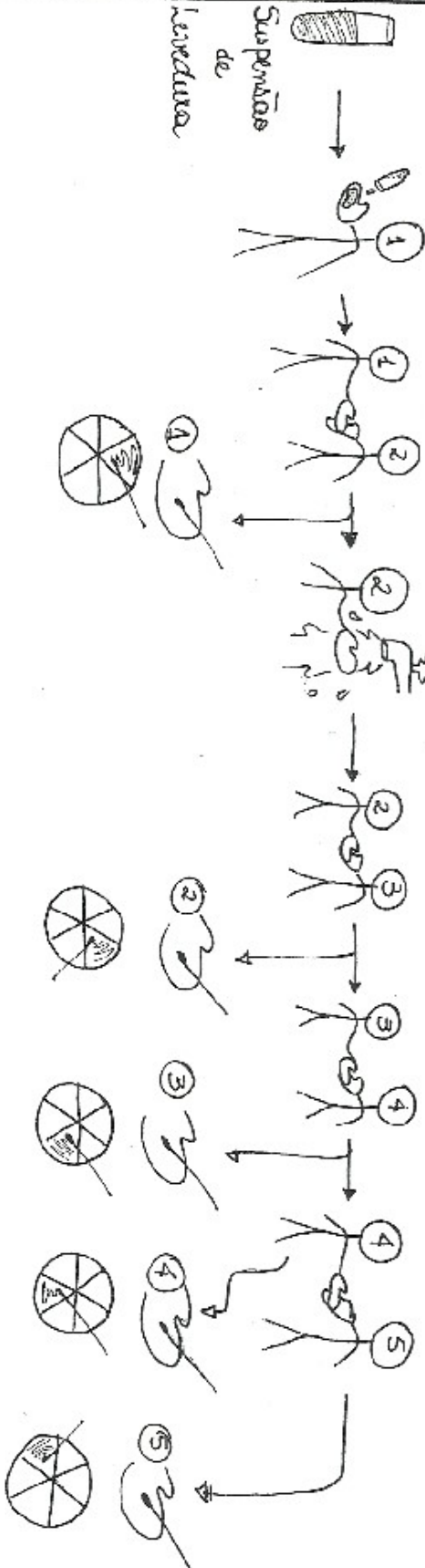
## C1. Experiência Contida.



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

## C2. Experiência Teste

Alinhe 2 lados a  
mão esquerda com água



**TODOS: LAVAR AS MÃOS!!**

## AULA PRÁTICA Nº 6

### **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.

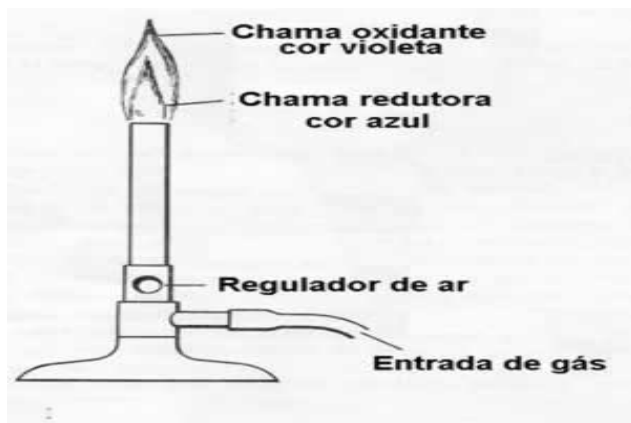
**MÉTODOS FÍSICOS**

**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.

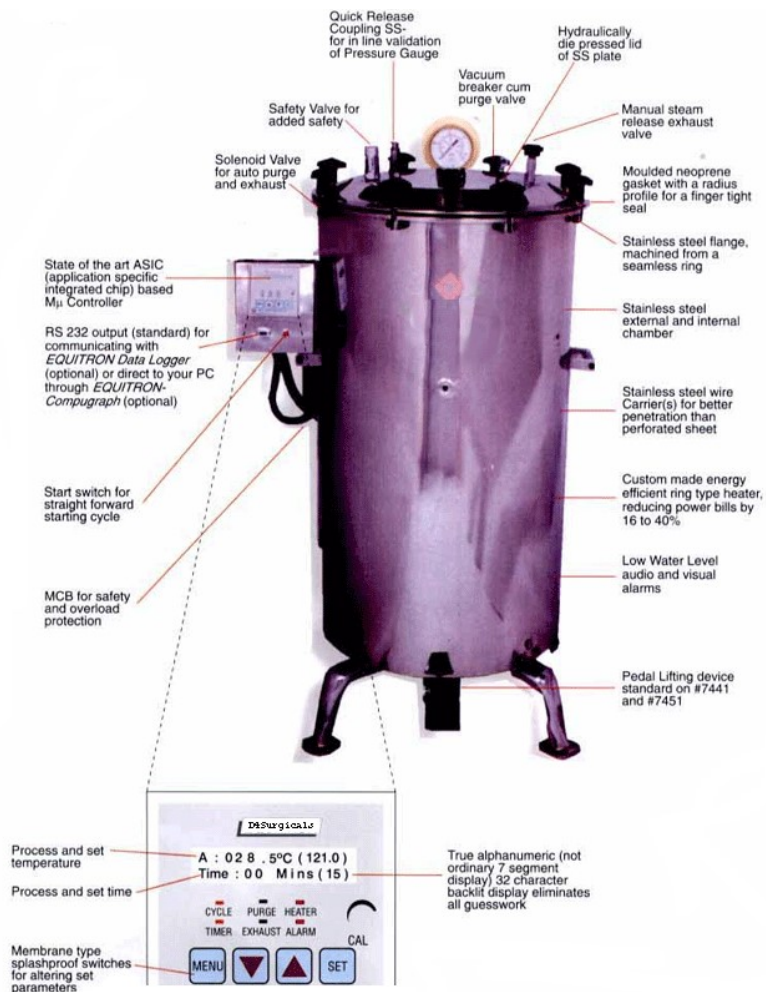
É utilizado para esterilizar líquidos que contém substâncias orgânicas.

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:**

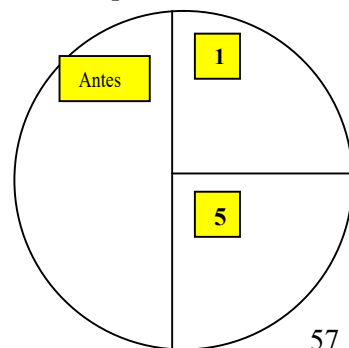
1. Divida o fundo da placa de Petri em 3 partes. Anote: ANTES, 1 minuto, 5 minutos; nome do microrganismo e o número do Grupo;

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:**

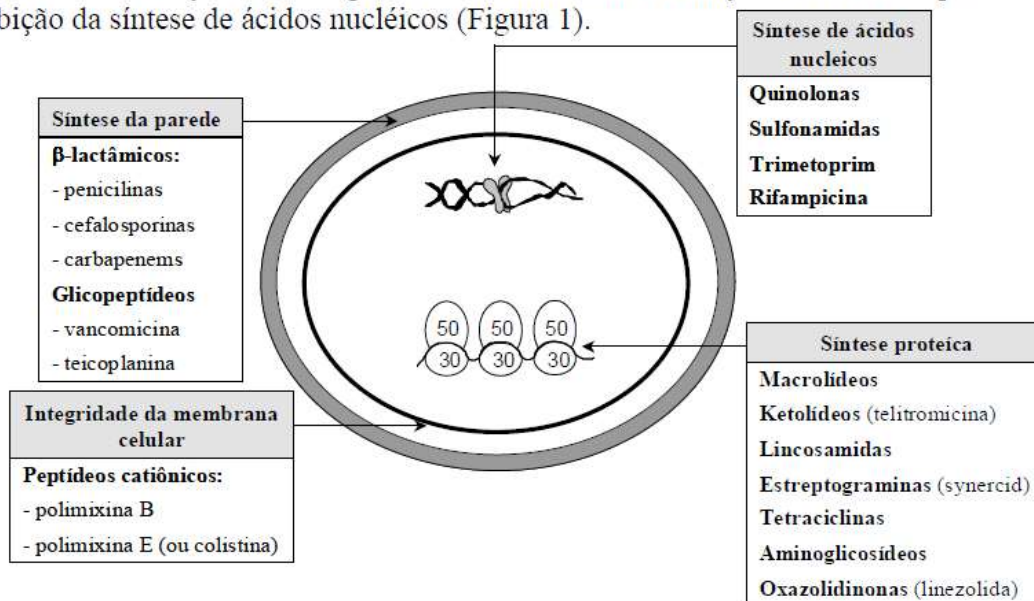
- Antibiótico, desinfetante e antisséptico;
- Esterilização e desinfecção.

## AULA PRÁTICA Nº 7 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 determinação 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

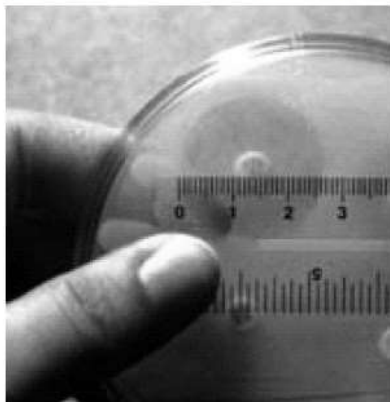
Cada grupo receberá:

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	-		
Ciprofloxacina	ENO (5)	≥ 23	≥ 23	17-22	17-22	≤ 16	≤ 16		
Cefotaxima	CTF (30)	≥ 21	≥ 21	18-20	18-20	≤ 17	≤ 17		

\* **Penicilinas:** penicilina; **Cefalosporina:** Cefotaxima **Macrólídeos:** eritromicina; **Quinolonas:** Ac. Nalidixico. Ciprofloxacina (Penicilina e Cefalosporinas são beta-lactâmicos)

### QUESTÕES PARA RELATÓRIO AULA PRÁTICA Nº7

- Cite critérios de seleção na escolha dos antibacterianos para realizar um teste de suscetibilidade.
- Segundo o antibiograma, mencione quais antibióticos são de amplo espectro e quais são de espectro restrito.
- Observando os resultados, em um caso de Osteomielite por *S. aureus*, que antibióticos poderiam ser utilizados no tratamento?

### PRINCIPAIS ANTIBIÓTICOS CLASSIFICAÇÃO

#### PENICILINAS

- Naturais:
  - Penicilina G (via oral ou intramuscular).
  - Penicilina G Sódica ou Potássica (endovenosa).
  - Penicilina V (via oral).
- Penicilinas resistentes às penicilinases.
  - Meticilina (via parenteral).
  - Isoxazolilpenicilinas.
    - 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)
- Ciprofloxacina.
- Ofloxacina.
- Levofloxacina.

## 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.