



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Instituto de Ciências Biomédicas



APOSTILA AULAS PRÁTICAS

Microbiologia Básica – BMM-271

Curso Diurno

2019

PROGRAMA – BMM-271

Fevereiro	Teóricas	Teóricas ou práticas
05 - Terça	Introdução ao estudo dos microrganismos Características gerais dos Fungos	Antifúngicos (T) Morfologia e diversidade dos fungos - Prática 1
08 - Sexta	Características gerais dos vírus	Multiplicação viral (T) Efeito citopático - Prática 2
12 - Terça	Morfologia e estruturas bacterianas (T)	Citologia e morfologia bacteriana - Prática 3
15 - Sexta	Nutrição bacteriana – Meios de cultura	Técnicas de semeadura e isolamento de bactérias - Prática 4
19 - Terça	Metabolismo bacteriano	Coloração de Gram e leitura prática anterior – Prática 5
22 - Sexta	Avaliação I	Genética bacteriana
26 - Terça	Mecanismos de ação e resistência aos antimicrobianos	Antibiograma – Prática 6
Março		
01 - Sexta	Microbiota humana residente	Leitura prática anterior
05 - Terça	Feriado	
08 - Sexta	Agentes físicos e químicos	Agentes físicos e químicos - Prática 7
12 - Terça	Patogenicidade bacteriana	Leitura prática anterior
15 - Sexta	Avaliação II	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> e <i>M. leprae</i>
19 - Terça	Gênero <i>Staphylococcus</i>	Gênero <i>Streptococcus</i>
22 - Sexta	Gênero <i>Clostridium</i>	Enterobactérias
26 - Terça	<i>Treponema pallidum</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>N. meningitidis</i>
29 - Sexta	Avaliação III	

Coordenadora (Curso Diurno): Profa. Dra. Silvana Cai (silvanac@icb.usp.br)

Docentes:

Profa. Dra. Marcia Mayer (mpamayer@icb.usp.br)
Profa. Dra. Maria Regina Lorenzetti Simionato (mrsimion@icb.usp.br)
Prof. Dr. Carlos Tabora (taborda@usp.br)
Profa. Dra. Kelly Ishida (ishidakelly@usp.br)
Prof. Dr. Lucio Freitas Junior (luciofreitasjunior@gmail.com)
Prof. Dr. Edison Durigon (edurigo@usp.br)
Profa. Dra. Rita de Cássia Café Ferreira (ritacafe@usp.br)
Prof. Dr. Robson Francisco de Souza (robfsouza@gmail.com)
Profa. Dra. Ana Márcia de Sá Guimarães (anamarcia@usp.br)
Profa. Dra. Ethel Bayer Santos (ebayersantos@usp.br)

Pós-graduandos (PAE): Lukas Raposo (lukasraposo@live.com)

Apoio Técnico: Márcia Harumi; Eduardo Gimenes; Zita Maria de Oliveira Gregório; Tatiana Alves dos Reis; Bruna Eduarda de Oliveira; Telma Alves Monezi.

CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO:

- Avaliação I: peso 3,5**
- Avaliação II: peso 3**
- Avaliação III: peso 3**
- Relatórios aulas práticas: peso 0,5**

PROVA SUBSTITUTIVA: SOMENTE para o aluno que faltou em uma das provas e com apresentação de atestado médico (validado por órgão público) após avaliação III. **O peso será correspondente à prova perdida e constará de TODA A MATÉRIA.**

DATA: 04/04/18 às 10 horas.

PROVA DE RECUPERAÇÃO: para os alunos com média abaixo de 5,0 e maior ou igual a 3,0 e 70% de presença. **MATÉRIA TODA.**

DATA: 27/05/18 às 10 horas.

BIBLIOGRAFIA

1. Trabulsi, L.R. Microbiologia. 5ª Ed., 2008.
2. Microbiologia de Brock, 12ª Ed., 2010.
3. Tortora, Funke, Case. Microbiologia. 10ª Ed., 2012.
4. Murray, Rosenthal, Pfaller. Microbiologia médica. 6ª Ed., 2010.
5. Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg. 2ª Ed., 2012.
6. Microbiologia ilustrada. Harvey, Champe, Fisher. 2ª Ed., 2008.
7. De Lorenzo, J.L. Microbiologia, ecologia e imunologia aplicadas à clínica odontológica. 2010.

SITES de INTERESSE EM VIROLOGIA

<http://www.microbiologybytes.com/introduction/structure.html>
<http://www.cgl.ucsf.edu/Research/virus/capsids/viruses.html>
http://www.virology.net/Big_Virology/BVHomePage.html
<http://www.youtube.com/watch?v=Rpi0emEGShQ&feature=related>
<http://www.youtube.com/watch?v=B7ITZgag6w0&NR=1>
<http://www.youtube.com/watch?v=-mtLXpgjHL0&feature=related>
http://www.youtube.com/watch?v=LipZq2K_Tos&feature=related

SITES de INTERESSE EM BACTERIOLOGIA

http://bervieira.sites.uol.com.br/bac_online.htm
<http://microbiologia.com.sapo.pt/bac1.htm>
<http://www.icb.usp.br/bmm/mariojac>
<http://science.jrank.org/pages/714/Bacteria.html>
<http://pathmicro.med.sc.edu/book/bact-sta.htm>
<http://www.youtube.com/watch?v=qBdYnRhdWcQ>
http://pt.wikibooks.org/wiki/Biologia_celular/Bact%C3%A9rias

LINK PARA VÁRIOS SITES DE MICOLOGIA

www.geocities.ws/ceuterra/linkcomfun.htm

NORMAS A SEREM SEGUIDAS NO LABORATÓRIO DE AULAS PRÁTICAS

1. O uso de AVENTAL branco, comprido e abotoado, é OBRIGATÓRIO no laboratório de aulas práticas, a fim de proteger a roupa de possível contaminação.
2. As bolsas, pacotes, livros etc., deverão ser colocados embaixo da bancada do laboratório de aulas práticas e **nunca** sobre as bancadas de trabalho.
3. Não comer no laboratório. Não beber água das torneiras. PROIBIDO USO DE CELULAR.
4. Manter as mãos, canetas, lápis e quaisquer outros objetos sem contato com a boca ou a face.
5. Antes de cada aula prática serão dadas as instruções sobre a maneira de executar os trabalhos. Não iniciar um trabalho prático sem haver lido, cuidadosamente, as instruções e compreendido o modo de execução da experiência e seu objetivo. Consultar o professor se encontrar dificuldades para entender ou para executar os trabalhos práticos. Verificar se o material está completo; no caso de falta de algum, dirija-se imediatamente ao professor ou técnico.
6. Durante o curso serão utilizados microrganismos que devem ser manipulados cuidadosamente.
7. Em caso de qualquer acidente (derramamento de cultura, por exemplo), comunicar imediatamente o professor ou pessoal técnico do laboratório, para que sejam tomadas as providências necessárias.
8. Todo o material contaminado (pipetas, bastões, lâminas, lamínulas etc.) deverá ser colocado em recipientes adequados (provetas, cubas com desinfetantes etc.) para ser esterilizado. **Nunca deixá-lo sobre a mesa de trabalho ou na pia.**
9. A alça de platina usada para sementeira ou repique de bactérias ou fungos deve ser aquecida até o rubro, tanto antes do uso como depois dele. Antes de tocar o material ou meio de cultura, deve-se esperar que a alça esfrie, mantendo-a próxima à chama.
10. Os tubos de cultura deverão ser colocados nas estantes ou suportes adequados e nunca nos bolsos do avental.
11. O estudante é responsável pelo equipamento com que trabalha. Os microscópios devem ser manuseados cuidadosamente. Qualquer dano ou defeito deve ser imediatamente comunicado ao professor. **Após o uso do microscópio, limpar a objetiva de imersão, usando lenço de papel.**
12. Após término dos trabalhos práticos, verificar se as torneiras de água e de gás estão fechadas, as lâmpadas desligadas e os microscópios limpos. Deixar o local de trabalho sempre limpo.
13. LAVAR SEMPRE AS MÃOS, APÓS O TRABALHO PRÁTICO.

PRÁTICA 1

MORFOLOGIA E DIVERSIDADE DOS FUNGOS: IDENTIFICAÇÃO DE BOLORES E LEVEDURAS

Profa. Dra. Kelly Ishida
Prof. Dr. Carlos Taborda

Material

Culturas de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Candida*
Lâminas prontas de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Candida*.
Placas de ágar Sabouraud
Placas para cultivo em lâmina e Placas para cultivo em lâmina-leveduras
Lâminas, lamínulas, corante lactofenol-azul-algodão, alças em “L”
Tubos com solução fisiológica.

MORFOLOGIA MACROSCÓPICA

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

Obtenção de colônia gigante.

Com alça de platina em L, retire um pequeno fragmento da colônia do tubo e coloque no centro de uma placa de Petri com ágar Sabouraud. Deixe à temperatura ambiente. Quando o desenvolvimento estiver satisfatório, submeta à ação do formol para matar o fungo e descreva os aspectos morfológicos característicos.

MORFOLOGIA MICROSCÓPICA

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

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

MICROCULTIVO DE BOLORES.

Utilizar placas de Petri contendo lâminas dispostas sobre um bastão de vidro.

Com todo cuidado de assepsia, coloque um pequeno quadrado (1 cm) de ágar Sabouraud, sobre a lâmina.

Com alça de platina, retire um pequeno fragmento de uma colônia escolhida (placa de fungo do ambiente) e semeie os lados do ágar. Coloque uma lamínula estéril sobre o ágar e água destilada estéril na placa para evitar dessecação do meio.

Feche a placa e deixe à temperatura ambiente.

Quando houver desenvolvimento satisfatório, submeta à ação do formol (0,5 ml durante 1 hora) retire a lamínula e o fragmento do meio de cultura.

Coloque numa lâmina, uma gota de lactofenol azul algodão e a lamínula em cima. Examinar ao microscópico e tentar identificar. Faça desenho:

MICROCULTIVO DE LEVEDURAS:

Utilizar placas de Petri contendo lâminas dispostas sobre um bastão de vidro.

Com todo cuidado e assepsia, coloque 1 ml de *Cornmeal ágar* + Tween 80 (fundido), sobre a lâmina. Com alça de platina, retire um pequeno fragmento da colônia de levedura e semeie em estria. Coloque uma lamínula estéril sobre o ágar e água destilada estéril na placa para evitar dessecação do meio. Feche a placa e deixe à temperatura ambiente.

Quando houver desenvolvimento satisfatório, submeta à ação do formol (0,5 ml durante 1 hora). Examine ao microscópico. Faça desenho:

DIVERSIDADE DE FUNGOS DO AR

Expor uma placa de Ágar Sabouraud por 20 min em sala de aula. Incubar em estufa. Observar a diversidade de tipos.

PRÁTICA 2

CULTURAS CELULARES E EFEITOS CITOPÁTICOS CAUSADOS POR VÍRUS

Prof. Dr. Lucio Freitas Junior e
Prof. Dr. Edison Durigon

1. Introdução

Vírus são parasitas intracelulares obrigatórios, portanto só conseguem multiplicar dentro de células vivas e permissivas. Isto significa que, para o isolamento e cultivo de vírus em laboratório deve-se dispor de sistemas celulares vivos que permitam a multiplicação viral. Estes sistemas celulares são: animais de laboratório, ovos embrionados de galinha e as culturas celulares. Os **animais de laboratórios** foram os primeiros a serem utilizados. Podem ser muito sensíveis ao isolamento de vírus, mas são de difícil obtenção e de manutenção cara, além de não permitirem um grande número de experimentos. Atualmente, os animais de laboratório só são utilizados para o estudo de alguns vírus não cultiváveis em outros sistemas (Ex.: hepatite B). Os **ovos embrionados de galinha** são bastante úteis para o cultivo de vírus, uma vez que o embrião em desenvolvimento e seus anexos apresentam muitas células banhadas por um meio de cultura ideal para muitos vírus. Os ovos embrionados de galinha são muito utilizados no isolamento, cultivo, diagnóstico e produção de vacinas para vírus como da gripe e da febre amarela. O estudo dos vírus teve um grande desenvolvimento a partir de 1940, quando as primeiras **culturas celulares** foram desenvolvidas, inicialmente por Enders e colaboradores, para a multiplicação *in vitro* do vírus da poliomielite.

As culturas celulares podem ser obtidas por vários métodos. A técnica de **cultura de explante** consiste na utilização de fragmentos de tecidos ou órgãos, que são cultivados em meio adequado para o crescimento celular. Os fragmentos de tecidos aderidos à superfície do frasco vão liberar espontaneamente as células, de maneira a formar uma camada de células. Outro método, utilizado para a obtenção de culturas celulares, baseia-se no **cultivo de células em suspensão**. Nesse caso grandes populações de células podem ser obtidas, sendo úteis para o preparo de grandes volumes de vírus com altos títulos, como na produção de antígenos ou de vacinas. Finalmente o método mais utilizado na prática, para a obtenção de culturas celulares, baseia-se na possibilidade de obtenção de **culturas em monocamada**. Essas culturas são preparadas através da separação das células presentes em fragmentos de tecido, ou em culturas já estabelecidas, e sua distribuição em frascos de cultivo. Como agentes dispersantes são utilizados: a tripsina, uma enzima proteolítica, que atua nas proteínas de adesão celular; ou agentes quelantes, como o EDTA, que atuam retirando o cálcio e o magnésio necessários para as ligações intercelulares ou das proteínas de adesão. As células dispersas através destes tratamentos são suspensas em meio nutritivo e distribuídas em frascos, nos quais, aderindo à superfície, multiplicam-se formando uma camada celular única, como um epitélio, o que facilita sua manipulação. O meio de cultivo possui uma composição definida de sais, aminoácidos e vitaminas, e é suplementado com soro (ex.: soro fetal bovino) que fornece um complexo de fatores que estimulam o crescimento celular.

Existem três tipos básicos de culturas celulares, cada uma apresentando vantagens e desvantagens. As **culturas primárias** são derivadas diretamente de tecidos, através dos métodos acima mencionados. São constituídas por células diplóides, isto é, células que apresentam o mesmo número de cromossomos da espécie que deu origem à cultura. São sensíveis ao cultivo de vírus. Entretanto, apresentam algumas desvantagens, entre elas, a maior dificuldade de obtenção (necessidade do animal ou fragmento de tecido), o alto custo, e

a possibilidade de contaminação por vírus latentes. As culturas primárias quando subcultivadas, em geral, degeneram e morrem após a segunda ou terceira passagem.

No decorrer de subcultivos das culturas primárias, pode haver a seleção de clones, capazes de sobreviver e se multiplicar indefinidamente, por 50 ou mais passagens. Esses clones dão origem às chamadas linhagens celulares, que podem ser de dois tipos: **linhagens diplóides** e **linhagens aneuplóides**, também denominadas linhagens estabelecidas ou contínuas.

Nas **linhagens diplóides** mais de 75% das células conservam seu caráter diplóide, resistindo de 30 a 50 subcultivos. São sensíveis para o isolamento de vírus, são de obtenção relativamente fácil, devendo ser mantidas congeladas em estoques, e reativadas quando necessário, para seu uso rotineiro. As linhagens diplóides contêm uma população de células mais homogênea que aquela das culturas primárias e podem ser utilizadas para o preparo de vacinas, já que o risco de contaminação com vírus latente não existe.

As células de **linhagem estabelecida ou contínua** contêm um cariótipo aneuplóide, isto é um número de cromossomos diferente de $2n$ e são consideradas linhagens a partir da 70ª passagem. Essas linhagens podem ser derivadas de tecido com caráter neoplásico ou de culturas normais que sofreram mutações. Esse tipo de cultura celular é extremamente útil para fins de diagnóstico, para isolamento e propagação de vírus (produção de reagentes). São as células de fácil, pois podem ser adquiridas em bancos de células e depois mantidas no laboratório através de repiques sucessivos. A principal desvantagem das culturas de linhagem contínua é sua menor sensibilidade ao cultivo dos vírus, em relação às culturas primárias e linhagens diplóides, devido à seleção clonal. Estas linhagens não podem ser utilizadas no preparo de vacinas, em virtude do caráter tumorigênico das células.

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

Introdução

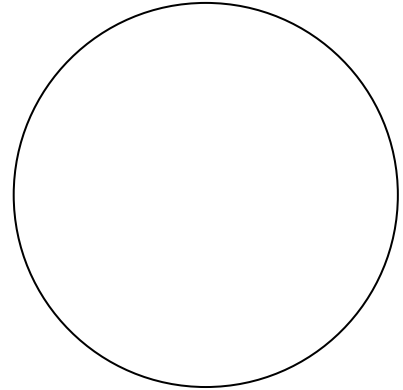
As alterações morfológicas que ocorrem quando células em cultura são infectadas por vírus são, até certo ponto, características para cada grupo de vírus e recebem o nome de efeito citopático. O efeito citopático não permite a identificação do vírus, mas fornece uma base para um agrupamento preliminar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

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

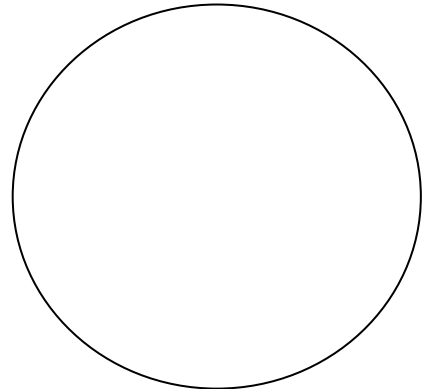
Exercício: Efeito Citopático

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

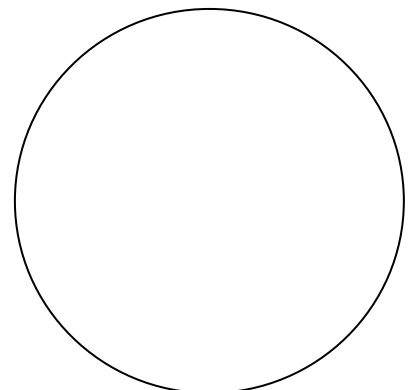
a) Células do tipo epitelial, de cultura normal, não inoculada, formando camada monocelular contínua. Apresentam o citoplasma corado em rosa e o núcleo em azul, com um, dois ou três nucléolos bem evidentes.



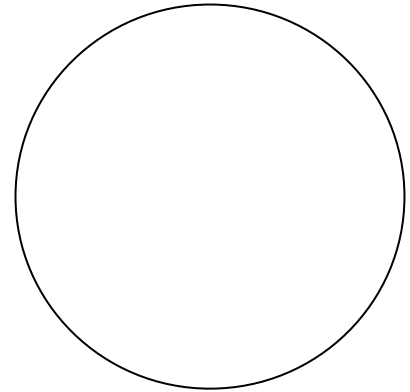
b) Efeito citopático produzido por **poliovírus** e outros picornavírus: as células apresentam-se pequenas, com formas irregulares, isoladas ou em grupos, com o citoplasma eosinófilo e núcleo picnótico e reduzido em volume.



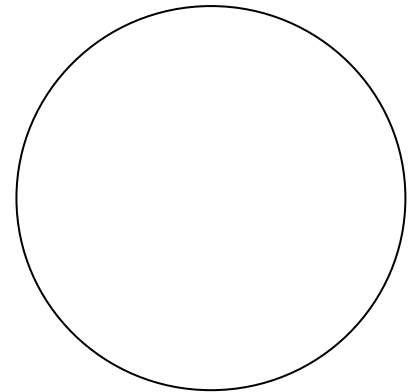
c) Efeito citopático produzido por **adenovírus**: as células infectadas apresentam-se grandes, arredondadas, e, às vezes, reunidas em "cachos", com alterações nucleares evidentes e características. **Corpúsculos de inclusão**: eosinófilos nucleares ou massas cristalinas basofílicas, segundo o tipo de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



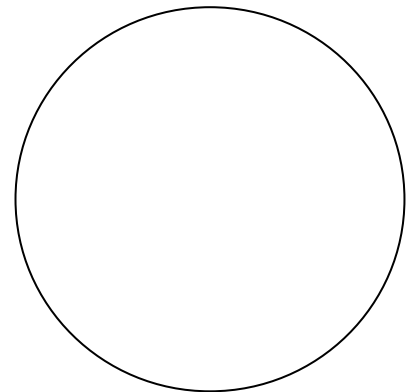
d) Efeito citopático produzido pelo **vírus do sarampo**: as células infectadas mostram-se multinucleadas, hiperplásicas, mas seus núcleos apresentam estruturas ainda conservadas. Há "pontes citoplasmáticas" intercelulares, que conferem a algumas células, forma estrelada. **Corpúsculos de inclusão**: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



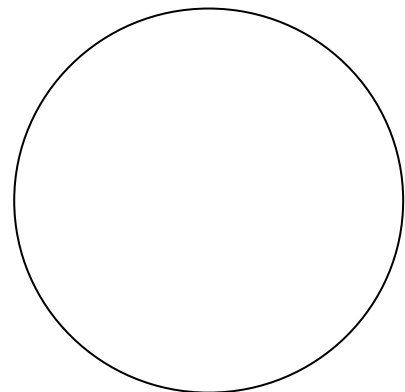
e) Efeito citopático produzido pelo vírus do **Herpes simplex**: as células infectadas apresentam-se mono ou multinucleadas (sincícios), com núcleos em graus variáveis de degeneração. **Corpúsculos de inclusão**: nucleares e eosinófilos, circundados por halo claro (corpúsculo de inclusão Lipschultz).



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



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



QUESTÕES PARA RELATÓRIO

- a) Consultando em seus livros de Microbiologia (De Lorenzo, Trabulsi ou outros indicados) os capítulos específicos sobre cada família de vírus preencha a tabela abaixo.
- b) Por que alguns vírus apresentam corpúsculos de inclusão nucleares enquanto outros citoplasmáticos? O que o local de observação dos corpúsculos de inclusão sugere sobre a multiplicação viral?
- c) Que estrutura viral está relacionada à formação de sincício? Por quê?

VÍRUS	FAMÍLIA	Presença de envoltório	Tipo de ácido nucléico	Formação de sincício	Local de montagem viral na célula
Poliovírus	<i>Picornaviridae</i>				
Adenovírus	<i>Adenoviridae</i>				
Vírus do sarampo	<i>Paramyxoviridae</i>				
Herpes simplex	<i>Herpesviridae</i>				
Vírus da vaccínia	<i>Poxviridae</i>				
Vírus da Citomegalia	<i>Herpesviridae</i>				

PRÁTICA 3
MORFOLOGIA BACTERIANA

Profa. Dra. Silvana Cai
Profa. Dra. Maria Regina Simionato

1. Material: lâminas com esfregaços de diferentes espécimes bacterianas, já coradas, e óleo de imersão.
2. Observação ao microscópio ótico, **objetiva de 100X**.
 - 2a. Depositar uma gota de óleo de imersão no centro do esfregaço corado
 - 2b. Colocar a lâmina no microscópio
 - 2c. Imergir a lente da objetiva de imersão (100X) no óleo, até encostá-la na lâmina
 - 2d. Levantar ao máximo o condensador e abrir totalmente o diafragma
 - 2e. Focalizar com o macrométrico até notar o campo e, a seguir, aperfeiçoar o foco com o micrométrico
 - 2f. Terminada a observação, retirar a lâmina
 - 2g. **Limpar a objetiva com lenço de papel e desligar o microscópio**
3. Observação das formas bacterianas, arranjos e estruturas:
 - 3a. Cocos Gram-positivos em cadeias (estreptococos)
 - 3b. Cocos Gram-positivos em cachos (estafilococos)
 - 3c. Bacilos Gram-positivos
 - 3d. Cocobacilos Gram-negativos
 - 3e. Cocos Gram-negativos (*Neisseria gonorrhoeae*) em secreção uretral
 - 3f. Esporos (coloração de Wirtz)
 - 3g. Espiralados (técnica de Fontana-Tribondeau, impregnação com sais de prata)
 - 3h. Cápsula (coloração negativa da cápsula)
4. Desenhar a morfologia, arranjo e coloração das bactérias focalizadas e suas estruturas.
5. Qual o aumento final das bactérias observadas?

PRÁTICA 4

TÉCNICAS DE SEMEADURA E ISOLAMENTO BACTERIANO

Profa. Dra. Silvana Cai
Profa. Dra. Márcia Mayer

Meios de cultura

As bactérias exigem determinados nutrientes para que possam se multiplicar. Para síntese de seus próprios constituintes devem dispor de fonte de carbono (açúcares), nitrogênio (peptonas), sais orgânicos, vitaminas e outros fatores de crescimento.

1. Meios básicos de cultura:

- a. **Caldo simples:** constituído basicamente de extrato de carne e peptona.
- b. **Ágar simples:** adiciona-se ágar ao caldo simples. O ágar é um polissacarídeo extraído de algas marinhas, que não é metabolizado por bactérias, com a finalidade de endurecer o meio de cultura líquido.

2. Classificação dos meios de cultura:

a. quanto à consistência:

- **meios líquidos:** utilizados para crescimento de microrganismos, em culturas puras.
- **meios sólidos** em placa de Petri: para obtenção de colônias isoladas, antibiograma, assimilação de açúcares.
- **meios semi-sólidos** em tubos: para verificar mobilidade e fermentação de açúcares.

b. quanto à função:

- **meios simples:** possuem os componentes essenciais para o crescimento de microrganismos pouco exigentes. Ex.: caldo simples.
- **meios enriquecidos:** meios simples acrescidos de substâncias de enriquecimento, tais como sangue de animais, soro, ovo, extrato de cérebro, açúcares, extrato de levedura, extrato de soja entre outros. Ex.: ágar sangue.
- **meios seletivos:** meios que favorecem o desenvolvimento de determinados microrganismos, mas inibem a proliferação de outros, devido à adição de substâncias inibidoras, determinados nutrientes, pH, pressão osmótica, etc.

Ex. de substâncias inibidoras:

- ◆ novobiocina: inibe *Proteus* spp.
- ◆ sais biliares: em altas concentrações (8,5%) inibem Gram-positivos e esporulados.
- ◆ azida sódica: inibe fungos.
- ◆ bacitracina: inibe espécies de *Streptococcus*, com exceção de *Streptococcus mutans*.
- ◆ cristal violeta (em certas concentrações): inibe Gram-positivos.
- ◆ telurito de potássio: favorece crescimento de Gram-positivos (Ex. *Streptococcus*)

Exemplo de meio seletivo: Mitis-salivarius-bacitracina (MSB) acrescido de sacarose. Este meio inibe consideravelmente o crescimento de várias espécies de *Streptococcus* enquanto que *S. mutans* cresce com facilidade.

- **meios seletivos diferenciais:** utilizados para isolamento e identificação presuntiva de bactérias. Permitem o desenvolvimento de grupos de microrganismos com características definidas, que os diferenciam dos demais grupos. Estas características geralmente podem ser evidenciadas através de formas ou cores das colônias ou coloração do meio ao redor das mesmas. Ex.: Ágar MacConkey. Neste meio, que contém lactose e vermelho neutro (indicador de pH), *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes* fermentam a lactose com produção de ácidos, o que diminui o pH, produzindo colônias de coloração rosa ou vermelho, enquanto *Proteus spp.*, *Shigella spp.* e *Salmonella spp.* (não fermentam a lactose), apresentam colônias incolores ou brancas. Este meio contém ainda sais biliares e cristal violeta.

TÉCNICAS DE ISOLAMENTO

Para determinar a espécie bacteriana presente em uma amostra clínica, é importante isolar o microrganismo em cultura pura, para posterior diagnóstico de uma doença, para teste de susceptibilidade a antibióticos, preparo de vacinas, etc.

Serão utilizadas duas técnicas: o **método de esgotamento por estrias** e o método de diluições e **semeadura em superfície de meio de cultura com alça de Drigalsky**.

Exercício1:

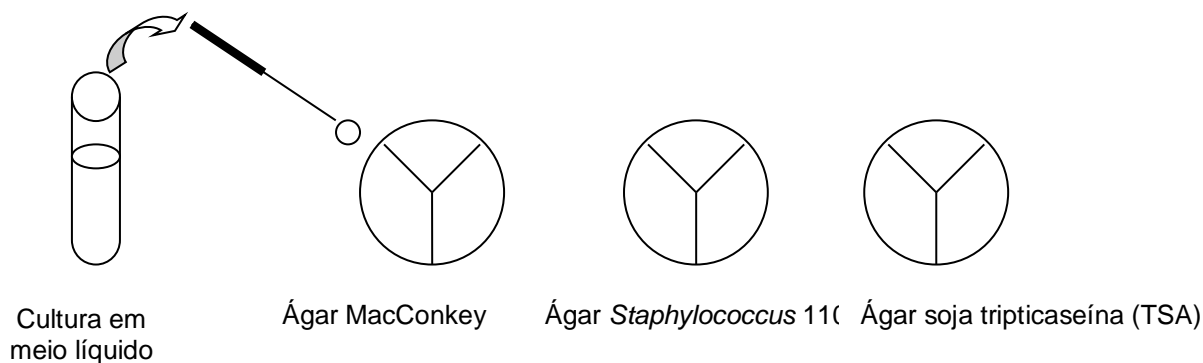
Objetivo: isolar as amostras bacterianas de uma cultura, em meio líquido, através da técnica de esgotamento por estrias.

Material: placas de Petri com meios de cultura

1 tubo com cultura de *E. coli*

1 tubo com cultura de *S. aureus*.

Semear cada tubo nos três meios de cultura.



- Observar:

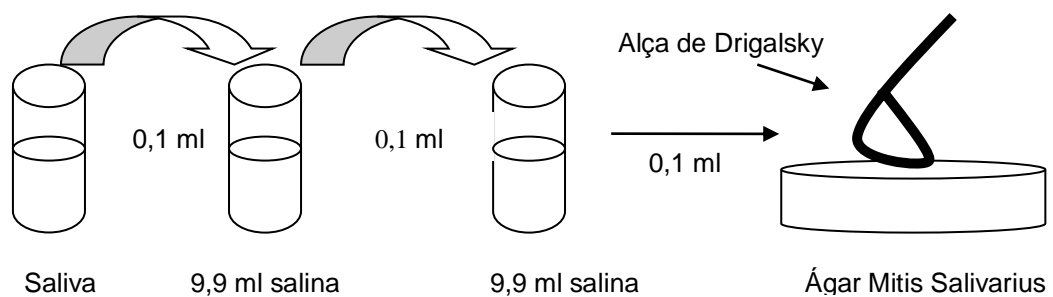
1. Quantidade de colônias em cada campo
2. Distribuição nos 3 campos
3. Aspectos morfológicos das colônias
4. Características tintoriais: coloração de Gram de cada tipo de colônia.

Complete a tabela e explique os resultados obtidos em cada meio de cultura

Resultados	Semeadura em estria								
	MacConkey			S110			TSA		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
No. de colônias									
Aspecto e morfologia das colônias									
Gram (morfologia celular)									

Exercício 2:

Objetivo: obtenção de crescimento bacteriano homogêneo em superfície de meio sólido através da utilização de alça de Drigalsky, após diluições do espécime clínico (Ex.: saliva).



Observar:

- Distribuição homogênea de crescimento
- Aspecto das colônias

PRÁTICA 5

TÉCNICA DE COLORAÇÃO DE GRAM

Profa. Dra. Silvana Cai

Profa. Dra. Maria Regina Simionato

Material necessário:

1. Cultura de bactérias em meios líquido e/ou sólido.
2. Lâminas para microscopia
3. Alça de platina
4. Tudo contendo solução salina esterilizada
5. Bateria para coloração de Gram
6. Microscópio, suporte para lâminas.

Procedimentos:

- Identificar as lâminas
- Esterilizar a alça bacteriológica “ao rubro” e, a seguir, deixá-la esfriar, conservando-a próxima ao fogo.
- Remover o material a ser analisado, sem contaminar.
- Depositar sobre a lâmina a suspensão bacteriana e espalhar (meio líquido) para meio sólido colocar primeiro 1 gota de solução salina para dissolução da colônia.
- Deixar o esfregaço secar naturalmente, nas proximidades do fogo.
- Fixar o esfregaço pelo calor e esperar a lâmina esfriar antes de realizar a coloração.
- Cobrir o esfregaço com **violeta de genciana**, esperar 1 minuto, lavar com água.
- Colocar **lugol**, esperar 1 minuto, lavar novamente com água. **O lugol é uma solução aquosa de iodo a 1% mais iodeto de potássio a 2%.**
- Descorar (diferenciar) com **álcool** até não se observar mais a saída de corante.
- Lavar imediatamente com água.
- Cobrir com **fucsina**, esperar 20 segundos e lavar com água. Secar a lâmina e observar ao microscópio.
- Anotar os resultados obtidos.
- Limpar as objetivas do microscópio e desligá-lo.

Coloração de Gram

A coloração de Gram foi desenvolvida em 1884 pelo bacteriologista holandês Hans Christian Gram. Esta coloração é uma das mais importantes e é rotineiramente utilizada no laboratório de Microbiologia. Ela divide as bactérias em dois grandes grupos: GRAM POSITIVAS e GRAM-NEGATIVAS, além de permitir o estudo da célula bacteriana quanto à sua morfologia (cocos ou bacilos) e arranjo.

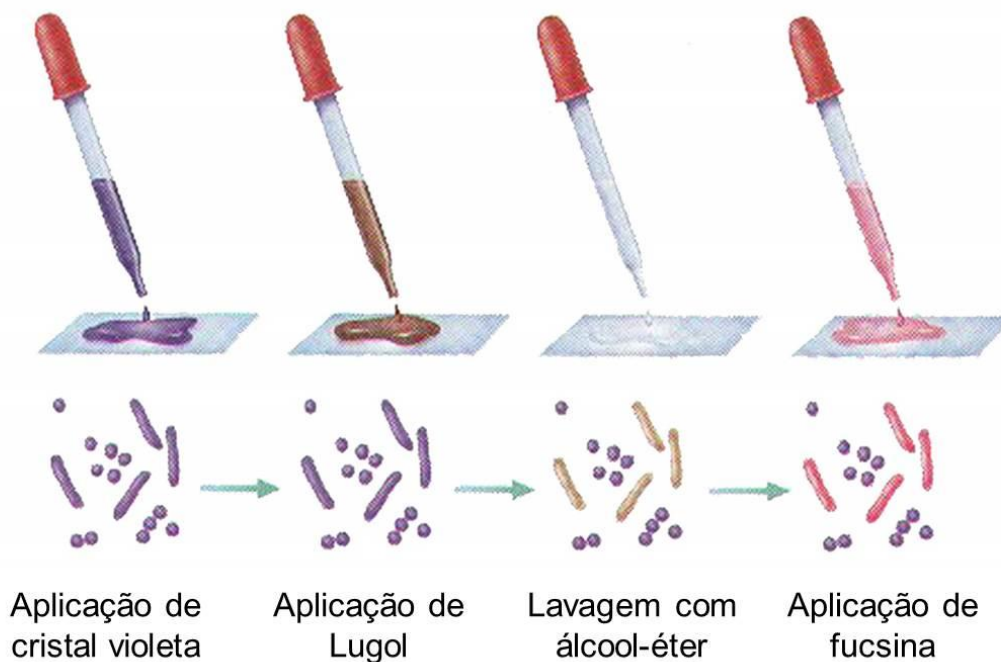
As bactérias capazes de reter o complexo formado pelo cristal violeta (CV) mais o lugol, formando o complexo iodo-pararosanilina coram-se em violeta (Gram-positivo), enquanto que, aquelas que não retêm o complexo, após aplicação do álcool, coram-se em vermelho (Gram-negativo), pela fucsina.

A coloração de Gram é uma coloração diferencial porque não cora todos os tipos de células igualmente. Essa maneira de reagir diferentemente, frente ao Gram, é em razão das diferenças na estrutura da parede celular das bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Bactérias gram-positivas possuem uma camada de peptidoglicano mais espessa que as gram-negativas. Quando aplicado em células gram-positivas e gram-negativas o cristal violeta (CV) e o lugol penetram facilmente, combinam-se formando o complexo CV-iodo, ficando retidos na parede celular.

Nas células gram-negativas o álcool remove lipídios da membrana externa celular, penetra pela fina camada de peptidoglicano e o complexo iodo-pararosanilina é removido da parede celular. Estas células são então contracoradas pelo segundo corante, a fucsina, e aparecem vermelhas.

Técnica de Coloração de Gram



Questão: Defina pela coloração de Gram as formas bacterianas observadas em aula

PRÁTICA 6 ANTIBIOGRAMA

Prof. Dr. Robson Francisco de Souza
Profa. Dra. Rita de Cássia Café Ferreira

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

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

Material:

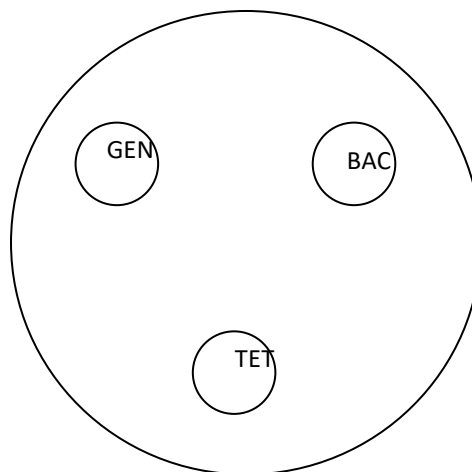
- Cultura bacteriana crescida por 18 horas (10^5 células por mL);
- Placas com meio de cultura Müller-Hinton;
- Discos de antibióticos;
- Cotonetes e pinças esterilizadas.

Procedimento:

1. Agitar bem a cultura bacteriana (*Escherichia coli* ou *Staphylococcus aureus*);
2. Umedecer o cotonete na suspensão bacteriana, retirando o excesso ao apertar o cotonete contra a parede interna do tubo;
3. Espalhar a suspensão bacteriana em toda a superfície do meio de cultura, de modo homogêneo, inclusive nas bordas;
4. Colocar os discos de antibióticos com auxílio da pinça sobre a superfície do meio e de modo equidistante (ver figura);
5. Incubar as placas a 37°C por 18 horas.

EXEMPLO:

Gentamicina (GEN)
Tetraciclina (TET)
Bacitracina (BAC)



Resultados

Leitura e interpretação: Verificar a presença ou ausência de halo de inibição ao redor dos discos. Medir o DIÂMETRO dos halos (em milímetros) e verificar nas tabelas o resultado obtido.

Interpretação de halos de inibição (em mm)

Antibiótico	concentração	sigla	resistente	intermediário	sensível
Tetraciclina	30µg	TET	11 ou -	12 a 14	15 ou +
Bacitracina	10 UI	BAC	8 ou -	9 a 12	13 ou +
Gentamicina	10µg	GEN	12 ou -	13 a 14	15 ou +
Kanamicina	30µg	KAN	13 ou -	14 a 17	18 ou +
Ciprofloxacina	5µg	CIP	15 ou -	16 a 20	21 ou +
Cefotaxima	30µg	CTX	14 ou -	15 a 22	23 ou +

Completar de acordo com os resultados obtidos por toda a turma

Grupo	Bactéria	TET	CIP	KAN	GEN	BAC	CTX
Esperado	<i>E. coli</i>	19 S	24 S	18 S	18 S	0 R	24 S
Esperado	<i>S. aureus</i>	18 S	18 I	17 I	19 S	0 R	27 S
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							
15							
16							
17							
18							
19							
20							

Tabela: Valores de halos inibitórios esperados

Agente	Código	Discos	Halos de inibição (mm)			Observação
			R	I	S	
Ácido Nalidíxico	NAL	10 µg	≤13	14-18	≥19	Uso indicado para Urina
Amicacina	AMI	30 µg	≤14	15-16	≥17	Para <i>Salmonella</i> e <i>Shigella</i> pode ocorrer resistência <i>in vivo</i> .
Amoxicilina + Clavulanato	AMC	20/10 µg	≤13	14-17	≥18	
Ampicilina	AMP	10 µg	≤13	14-16	≥17	Representa também amoxicilina
Ampicilina + Sulbactam	ASB	10/10 µg	≤11	12-14	≥15	
Bacitracina	BAC	10 UI	≤8	9-12	≥13	
Cefaclor	CFC	30 µg	≤14	15-17	≥18	Ver cefalotina
Cefalotina	CFL	30 µg	≤14	15-17	≥18	Pode prever resultados para cefapirina, cefradina, cefalexina, cefaclor e cefadroxil.
Cefamandole	-	30 µg	≤14	15-17	≥18	
Cefazolina	CFZ	30 µg	≤19	20-22	≥23	
Cefepime	CPM	30 µg	≤14	15-17	≥18	
Cefetamet	CFT	10 µg	≤14	15-17	≥18	Não aplicável em <i>Morganella spp</i>
Cefixime	CFM	5 µg	≤15	16-18	≥19	Não aplicável em <i>Morganella spp</i>
Cefmetazole	-	30 µg	≤12	13-15	≥16	
Cefonicid	-	30 µg	≤14	15-17	≥18	
Cefoperazona	-	75 µg	≤15	16-20	≥21	
Cefotaxima	CTX	30 µg	≤14	15-22	≥23	
Cefotetan	* -	30 µg	≤12	13-15	≥16	
Cefoxitina	CFO	30 µg	≤14	15-17	≥18	
Cefpodoxima	-	10 µg	≤17	18-20	≥21	Não aplicável em <i>Morganella spp</i>
Cefprozil	-	30 µg	≤14	15-17	≥18	Foram relatados casos de falsa sensibilidade em cepas de <i>Providencia spp</i> . Não usar para esta bactéria.
Ceftazidima	CAZ	30 µg	≤17	18-20	≥21	
Ceftriaxona	CRO	30 µg	≤19	20-22	≥23	ídem cefotaxima
Cefuroxima axetil (oral)	CRX	30 µg	≤14	15-22	≥18	
Cefuroxima sódica (parenteral)	CRX	30 µg	≤14	15-22	≥23	
Ciprofloxacina	CIP	5 µg	≤15	16-20	≥21	
Cloranfenicol	CLO	30 µg	≤12	13-17	≥18	Uso não indicado na rotina de urina
Doripenem	-	10 µg	≤19	20-22	≥23	Ver item 9
Doxiciclina	DOX	30 µg	≤10	11-13	≥14	Ver tetraciclina
Ertapenem	-	10 µg	≤19	20-22	≥23	Ver item 9
Gatifloxacina	-	5 µg	≤14	15-17	≥18	
Gentamicina	GEN	10 µg	≤12	13-14	≥15	
Imipenem	IPM	10 µg	≤19	20-22	≥23	Ver item 9
Kanamicina	-	30 µg	≤13	14-17	≥18	
Levofloxacina	LVX	5 µg	≤13	14-16	≥17	
Lomefloxacina	LMX	10 µg	≤18	19-21	≥22	
Meropenem	MER	10 µg	≤19	20-22	≥23	Ver item 9
Netilmicina	NET	30 µg	≤12	13-14	≥15	Ver amicacina
Nitrofurantoína	NIT	300 µg	≤14	15-16	≥17	Uso indicado para urina
Norfloxacina	NOR	10 µg	≤12	13-16	≥17	
Piperacilina + Tazobactam	PPT	100/10 µg	≤17	18-20	≥21	
Ofloxacina	OFX	5 µg	≤12	13-15	≥16	
Sulfametoxazol + Trimetoprim	SUT	23,75/1,25 µg	≤10	11-15	≥16	
Sulfonamidas	SUL	250 ou 300 µg	≤12	13-16	≥17	O disco de sulfisoxazol pode representar este grupo
Ticarcilina + clavulanato	TIC	75/10 µg	≤14	15-19	≥20	
Tetraciclina	TET	30 µg	≤11	12-14	≥15	Sensibilidade presumida para doxiciclina e minociclina. Quando intermediários à tetraciclina podem ser sensíveis aos demais.
Tobramicina	TOB	10 µg	≤12	13-14	≥15	Ver amicacina
Trimetoprim	TRI	5 µg	≤10	11-15	≥16	

PRÁTICA 7

CONTROLE DO CRESCIMENTO BACTERIANO POR AGENTES FÍSICOS E QUÍMICOS

Profa. Dra. Silvana Cai

Prof. Dra. Maria Regina Simionato

Profa. Dra. Marcia Mayer

I. Ação de agentes químicos

Material recebido:

- 2 tubos - caldo com *Escherichia coli*;
- 2 tubos - caldo com *Bacillus subtilis*;
- 2 placas de Ágar Nutriente divididas em 3 partes;
- Desinfetante comercial (concentrado e diluído).

Procedimento :

- Transferir uma alçada de cada tubo para a área Controle da placa de Petri;
- Transferir 0,5 ml do desinfetante testado (concentrado e diluído) para o tubo contendo 1 ml de cultura bacteriana;
- Homogeneizar os tubos e aguardar 10 minutos;
- Transferir uma alçada de cada tubo para respectiva área da placa de Petri;
- Identificar as placas semeadas e incubar.

RESULTADOS:

Espécie bacteriana	Controle	Concentrado	Diluído
<i>Escherichia coli</i>			
<i>Bacillus subtilis</i>			

1.2. Antissepsia das mãos

- 1.1. Dividir o fundo da placa de Petri contendo meio de cultura em 3 partes iguais.
- 1.2. Com auxílio de um cotonete, previamente esterilizado e umedecido em salina esterilizada, esfregar sobre a palma da mão. A seguir, semear 1/3 da placa com o cotonete e identificar.

1.3. Lavar as mãos com detergente, vigorosamente, em todas as superfícies, durante 1 minuto. A seguir, realize o procedimento anterior (1.2). Semear na placa e identificar.

1.4. Aplicar álcool a 70%, durante 1 minuto, nas mãos pré-lavadas. A seguir, realize o procedimento 1.2, semear na placa e identificar”.

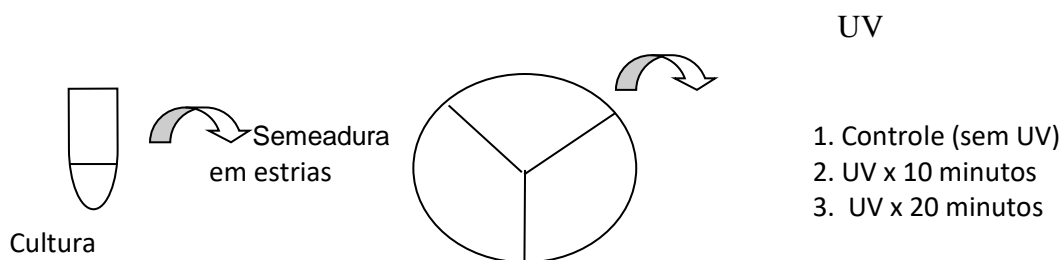
- As placas serão incubadas a 37° C x 24 horas.

RESULTADOS:

	Crescimento	Gram
Mãos sem lavar		
Antissepsia com álcool		

II. Ação de Agentes Físicos

2.1. Ação da luz Ultravioleta (UV) - Procedimento demonstrativo

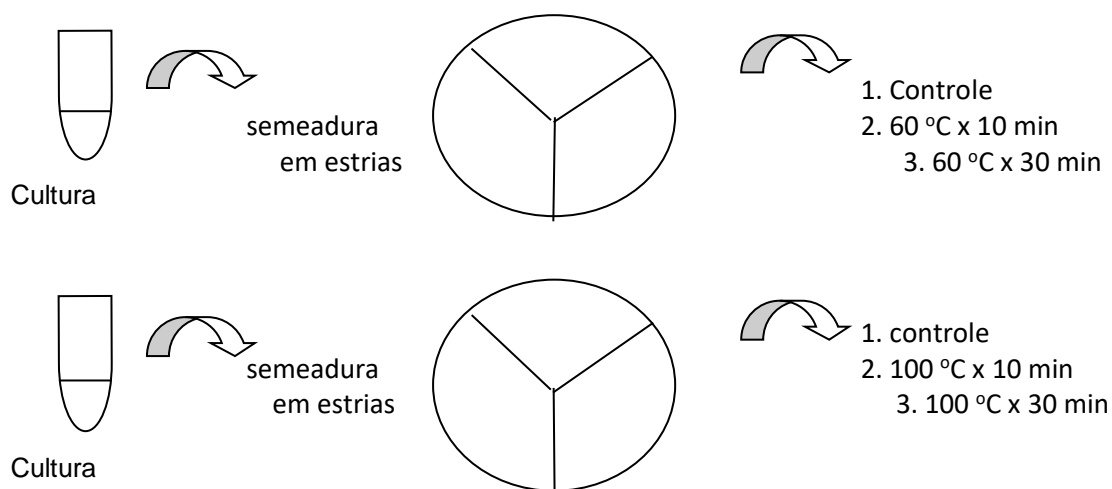


Incubação: as placas permanecerão embrulhadas em papel por 24 horas a 37 °C.

RESULTADOS:

	<i>E. coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Controle		
U.V. x 10 min		
U.V. x 20 min.		

2.2. Ação do calor - Procedimento demonstrativo



Incubação: as placas permanecerão por 24 horas a 37 °C.

RESULTADOS:

	<i>E. coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Controle		
60 °C x 10 min		
60 °C x 30 min.		
100 °C x 10 min.		
100 °C x 30 min		