Aulas Práticas de

Bacteriologia Básica

INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

IPTSP UFG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS • UFG

Reitoria

Edward Madureira Brasil

Vice-Reitoria

Sandramara Matias Chaves

Pro-Reitoria de Graduação

Jaqueline Araujo Civardi

Organização

Lilian Carla Carneiro

Autores

Felipe Augusto de Sousa Moraes • IPTSP UFG

Giovana Alice Sampaio Soares • IPTSP UFG

Lilian Carla Carneiro • IPTSP UFG

Mônica Santiago Barbosa • IPTSP UFG

Revisão

Aroldo Vieira de Moraes Filho • Medicina UFG

Débora de Jesus Pires • Itumbiara UEG

Erika Izumi • Santa Helena UFTPR

Lara Stefânia Netto de oliveira Leão • IPTSP UFG

Mônica de Oliveira Santos • FM UFG

Nathalia Almeida de Sousa Gândara • IPTSP UFG

Rita de Cássia Rampazzo • IBMP

Rodrigo da Silva Santos • UFG

Rosália Santos Amorim Jesuíno • ICB UFG

Técnicos e Colaboradores

Aline Cristine Magalhães Costa Messias • IPTSP UFG

Gráfica UFG

Goiânia, 2020.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
GPT/BC/UFG

A924 Aulas práticas de Bacteriologia Básica. [e-book] / organizadora, Lilian Carla Carneiro. – Dados eletrônicos. - Goiânia : Gráfica UFG, 2020. 17 p. : il.

Inclui bibliografia.
ISBN: 978-85-495-0317-6

Modo de acesso: World Wide Web: < http://temporario.ciar.ufg.br/IPTSP/bacteriologia_basica/index.html.> 1. Biologia – Estudo e ensino. 2. Educação. 3. Ensino – Metodologia. I. Carneiro, Lilian Carla. CDU: 57:378.147.091.33-027.22

Bibliotecária responsável: Adriana P. Aguiar / CRB1: 3172

CENTRO INTEGRADO DE APRENDIZAGEM EM REDE • CIAR

Direção

Marlília de Goyaz

Vice-Direção

Silva Figueiredo

Coordenação de Publicação

Ana Bandeira

Desenvolvimento do e-book

Leandro Abreu

Diagramação

Laryssa Tavarez

Suporte Técnico

Amilton Araújo

A Importância da Atividade Prática na Aprendizagem

A atividade prática envolve a interação entre o aluno e materiais concretos, sejam objetos, instrumentos, microscópios, entre outros. Esse contato possibilita o estabelecimento do diálogo entre teoria e prática. Na ocasião da atividade prática o aluno aprende a formular hipóteses, experimentar, observar, trabalhar em grupo e a gerar conclusões; portanto, ele é estimulado à construção do pensamento científico, bem como à paciência, responsabilidade e tolerância (BARTZIK; ZANDER, 2016).

As atividades práticas são uma forma de instigar a criatividade, a crítica e a reflexão no ensino, viabilizando um aprendizado mais efetivo aos discentes. O educador possui um papel ativo como mediador do processo, incentivando a aproximação entre o parecer do aluno e a realidade (COSTA; BATISTA, 2017).

Comprovadamente alunos consideram as aulas práticas como facilitadoras da aprendizagem, até mesmo aqueles que nunca tiveram contato com essa forma de ensino concordam com essa ideia. A memorização para uma prova não implica em um conhecimento sólido, independentemente do assunto. Nesse sentido as aulas práticas são um diferencial, pois, ao colocar o aluno como "investigador", ele edifica os seus conhecimentos e dificilmente esquece essa experiência. Essas aulas concretizam aquilo que estava apenas no imaginário dos discentes, inspirando o interesse pelo conteúdo. Quando estão pessoalmente envolvidos, eles assimilam melhor, retêm o conhecimento e desenvolvem habilidades adequadamente (LIMA; GARCIA, 2011).

Buscar um ensino de Biologia implementando atividades em que a sala de aula alcance o cotidiano, pode ser um bom ensejo para tornar a aprendizagem mais interessante e prazerosa, além de ser uma ferramenta para a construção da alfabetização científica. A alfabetização científica implica na capacidade de propor e analisar argumentos baseada em evidência e aplicar conclusões apropriadas. Essa pode se iniciar na escola, mas não se restringe a ela. Um cidadão cientificamente alfabetizado avalia a qualidade da informação a partir de suas fontes e dos métodos aplicados para produzi-la. Se oferecer aos alunos a oportunidade de pensar, ele será conduzido a conhecimentos que levarão para a vida.

Vale ressaltar que tornar o ensino agradável não deve se limitar a estruturas e equipamentos. Aulas práticas envolventes e inovadoras, que incitem os alunos a refletir e formar seus conhecimentos podem ser feitas em circunstâncias alternativas, à medida que integramos a biologia, parte do estudo está dentro de cada pessoa (LIMA; GARCIA, 2011).

Referências

BARTZIK, F.; ZANDER, L. D., A Importância Das Aulas Práticas De Ciências No Ensino Fundamental. **Revista @rquivo Brasileiro de Educação**, Belo Horizonte, v.4, n. 8, mai-ago, 2016.

COSTA, G. R.; BATISTA, K. M., A Importância Das Atividades Práticas Nas Aulas De Ciências Nas Turmas Do Ensino Fundamental. **REVASF**, Petrolina-PE, vol. 7, n.12, p. 06-20, abril, 2017.

LIMA, D. B.; GARCIA, R. N., Uma investigação sobre a importância das aulas práticas de Biologia no Ensino Médio. **Cadernos do Aplicação**, Porto Alegre, v. 24, n. 1, jan./jun. 2011.

Biossegurança no Laboratório de Microbiologia

A biossegurança abrange um conjunto de medidas que visam prevenir, controlar, mitigar ou eliminar riscos inerentes às atividades que possam interferir ou comprometer a qualidade de vida, a saúde humana e o meio ambiente. Desta forma, a implementação de práticas adequadas no laboratório é primordial para evitar acidentes e garantir a qualidade das atividades realizadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Boas Práticas Laboratoriais

- É **indispensável** o uso de avental no laboratório. O avental deve ser, de preferência, comprido, com mangas compridas e estar abotoado. Removê-lo antes de deixar o laboratório;
- **Sempre usar luvas**, enquanto manipular amostras. Removê-las e lavar as mãos, quando o procedimento estiver concluído;
- Vestuário: **calças compridas** e **sapatos fechados** (idealmente de material não poroso e resistente), para impedir lesões no caso de acidentes com materiais perfurocortantes, substâncias químicas e materiais biológicos;
- Cabelos compridos devem permanecer **sempre presos** ou com gorros para evitar contato com materiais biológicos ou químicos;
- Evitar usar lentes de contato nos olhos em ambiente laboratorial, pois podem manter agentes infecciosos na mucosa ocular;
- As unhas devem ser, de preferência, curtas (o ideal é que não ultrapassem as pontas dos dedos);
- Evitar o uso de adornos, como relógios, joias ou bijuterias e piercings, pois podem servir como depósitos para agentes infecciosos ou químicos;
- É **proibido** ingerir alimentos, beber ou fumar no laboratório;
- Evitar levar as mãos à boca, nariz, olhos, rosto ou cabelo, no laboratório;
- Utilizar na bancada somente o material necessário ao trabalho prático, como: roteiro de aula, papel ou caderno para anotação e caneta. Material extra deixar nas prateleiras abaixo das bancadas;
- Prestar atenção às atividades dos colegas ao lado, para evitar que materiais incompatíveis sejam manipulados ao mesmo tempo (exemplo: álcool e fogo);
- Evitar brincadeiras, distrações e conversas paralelas durante os procedimentos, pois podem causar sérios acidentes;
- Em caso de qualquer acidente (derramamento de culturas, quebra de placas, ferimentos, respingo de cultura etc.) comunicar **imediatamente** o professor ou o pessoal técnico responsável pela aula prática;
- Não cheirar placas de cultura, a inalação de agentes microbianos pode resultar em infecções;
- Não cheirar, nem provar substância alguma; pois algumas substâncias quando inaladas ou engolidas podem provocar queimaduras ou lesões;

- Descarte do material: (1) materiais contaminados devem ser colocados nos recipientes próprios existentes nos laboratórios; (2) placas de Petri utilizadas deverão ser deixadas **tampadas** sobre a bancada; (3) lâminas fornecidas pelos professores para visualização deverão ser deixadas sobre a bancada e tubos com culturas deverão ser deixados nas estantes;
- Terminados os trabalhos práticos: (1) flambar alças e fios de platina; (2) verificar se as torneiras de água e gás estão fechadas; (3) desligar lâmpadas e microscópios; (4) limpar os microscópios e cobri-los com a capa; (5) tirar o avental e guardar; (5) lavar cuidadosamente as mãos;
- As **superfícies de trabalho do laboratório** devem ser **descontaminadas** ao final das atividades e no final do dia.

A lavagem frequente das mãos é uma atitude importante na prevenção de contaminações. Devem ser lavadas sempre, após o contato com amostras, após a conclusão das práticas, após a remoção das luvas, antes de deixar o laboratório e antes de manipular comida ou bebida. Ensaboar todos os dedos e entre eles, as costas das mãos e os punhos e procure não tocar na torneira depois de lavar as mãos, faça isso com um a tolha de papel.

Referências

Brasil. Ministério da Saúde. Biossegurança em saúde: prioridades e estratégias de ação / Ministério da Saúde, Organização Pan-Americana da Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 242 p.: il. – (Série B. Textos Básicos de Saúde).

ZOCHIO, L. B. Biossegurança em Laboratórios de Análises Clínicas. Academia de Ciência e Tecnologia. São José do Rio Preto, 2009.

Coloração de Gram

Introdução

Em 1884, Hans Cristian Joaquim Gram observou que ao tratar bactérias com diferentes corantes, elas adquiriam cores distintas. Isso permitiu classificá-las em dois grupos: as que se coravam de roxas, então denominadas de Gram-positivas, e as que se coravam de rosa ou vermelhas, chamadas de Gram-negativas. Essa classificação se refere às diferenças da composição da parede celular. As bactérias Gram-negativas possuem uma fina camada de peptidoglicano e uma membrana externa composta por bicamada lipídica, a qual se solubiliza na presença do álcool-acetona (agente diferenciador), perdendo a coloração do cristal violeta (corante primário), adquirindo a coloração rosa ou vermelho do corante secundário, safranina ou fucsina. Já as bactérias Gram-positivas possuem uma espessa camada de peptidoglicano e grandes quantidades de ácido teicóico, adquirem a coloração violeta ou roxa pela capacidade em reter o corante primário na presença do agente diferenciador, conforme descrito na figura 1 (OPLUSTIL et al., 2010).

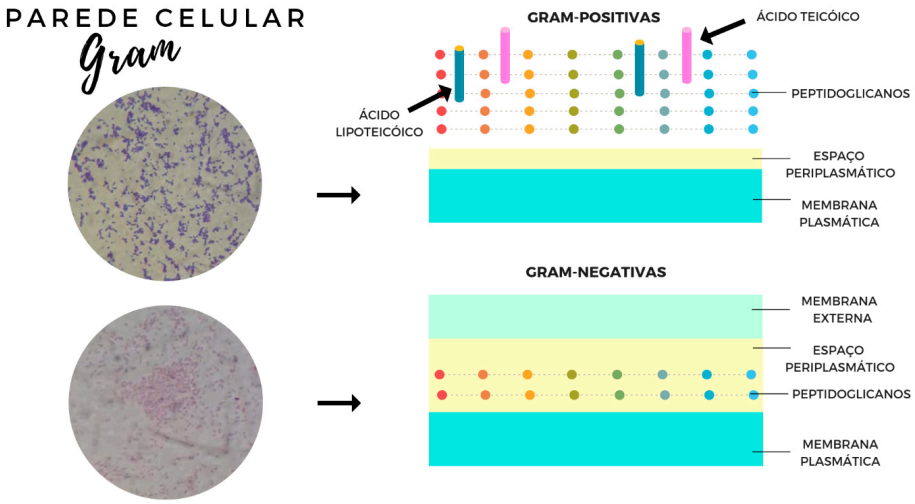

Figura 1. Esquema ilustrativo da estrutura da parede celular de bactérias gram-negativas e gram-positivas. **Fonte:** acervo próprio.

Na técnica de Gram, um esfregaço é fixado na lâmina pelo calor e coberto com um corante primário, geralmente o cristal violeta. Após um minuto, o esfregaço é lavado e em seguida cobre-se a lâmina com lugol, que age como mordente (fixador), fixando o cristal violeta. Nessa etapa tanto as bactérias Gram-negativas como as Gram-positivas permanecem com a coloração violeta. Em seguida, a lâmina é lavada com uma solução de álcool-acetona a 95%. Esta solução age como descolorante, retira o cristal violeta das bactérias Gram-negativas e deixando-as incolores. Após essa etapa o excesso do álcool é retirado e em seguida as bactérias são submetidas ao corante secundário, podendo ser a fucsina ou safranina a 0,1 a 0,2%. A lâmina é lavada, seca com papel-filtro e observada ao microscópio óptico, aplicar uma gota de óleo de imersão e observar na objetiva de imersão (100x) (Figura 2).

Objetivos

- Compreender e aprender sobre a técnica de Gram;
- Visualizar as diferentes morfologias entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Materiais

- Cultura de bactérias Gram-positivas e/ou cultura de bactérias Gram-negativas;
- Solução salina;
- Alça de repicagem;
- Lâminas para microscopia;
- Bico de Bunsen;
- Cristal-violeta (corante);
- Lugol (mordente);
- Álcool-acetona (descorante);
- Fucsina ou safranina (corante);
- Papel absorvente;
- Óleo de imersão;
- Microscópio óptico.

Metodologia

1) Confecção do esfregaço

Confeccionar o esfregaço colocando uma gota de salina sobre a lâmina; com a alça bacteriológica tocar a colônia isolada e espalhar na salina com movimentos ovais. Fixar com calor, passando a lâmina sobre chama de bico de Bunsen de 2 a 3 vezes até completa secagem do esfregaço.

2) Coloração e visualização

Cobrir com cristal violeta por 1 minuto. Lavar com água corrente. Cobrir com lugol 1% por 1 minuto. Lavar com água corrente. Aplicar o agente diferenciador álcool-acetona 95% por 10 a 20 segundos. Lavar com água corrente. Cobrir com fucsina ou safranina (0,1 a 0,2%) por 30 segundos. Lavar com água corrente e secar com papel-filtro. Observar no microscópio óptico com objetivas de 40x. Colocar uma gota de óleo de imersão sobre a lâmina e ajustar para objetiva de 100x (limpar o óleo de imersão delicadamente com papel absorvente se for voltar a utilizar outras objetivas ou trocar a lâmina).

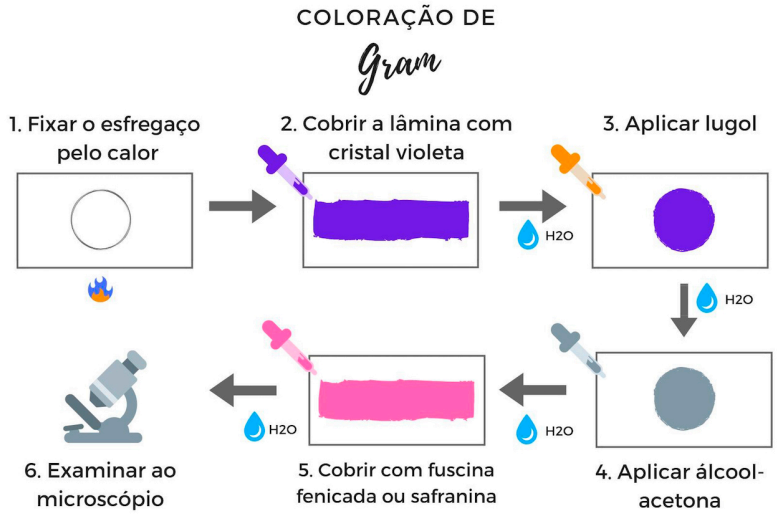

Figura 2. Etapas do procedimento da coloração de Gram. **Fonte:** acervo próprio.

Questões para Estudo

1. Na técnica de Gram, qual solução é o agente diferenciador e qual é considerada mordente?
2. Explique por que as bactérias Gram-negativas apresentam coloração diferente das bactérias Gram-positivas.

Referências

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S; MICHAEL, A.P. **Microbiologia Médica**. 6a Ed. Editora Elsevier, 2009.

OPLUSTIL, C.P. et al. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica**. 3. Ed. São Paulo: Sarvier, 2010.

Isolamento de Microrganismos do Ambiente

Introdução

Os microrganismos são formas de vida microscópicas, individualmente diminutas para serem vistas a olho nu. O grupo abrange bactérias, fungos, protozoários, algas microscópicas e os vírus. Embora alguns sejam associados a doenças graves, a infecções desagradáveis, ou inconvenientes comuns como a deterioração de alimentos, a maioria dos microrganismos contribui de forma fundamental na manutenção do equilíbrio dos organismos vivos e do ambiente (TORTORA et al., 2012).

Diferentes espécies bacterianas colonizam o corpo humano, seja de forma transitória ou em uma relação parasitária permanente. Da mesma maneira, as bactérias estão presentes no ambiente que nos cerca, incluindo o ar, a água e a comida. Muitas dessas bactérias são relativamente não virulentas, enquanto outras podem provocar doenças que ameaçam a vida (MURRAY et al., 2017).

Diversas superfícies, como celulares e teclados de computador, podem ser contaminadas e tornam-se fômites transmitindo organismos infecciosos. Esses agentes patogênicos podem sobreviver por longos períodos em objetos, a menos que sejam eliminados por procedimentos de desinfecção ou esterilização (KOSCOVA et al., 2018).

Para realizar o isolamento, o meio indicado é o Ágar Nutriente. Esse é um meio muito utilizado no laboratório de microbiologia, por ser relativamente simples, barato e de fácil preparação (ANVISA, 2013). Desse modo, o isolamento pode auxiliar na detecção de microrganismos, a fim de propor medidas de higiene, avaliar o grau de contaminação de superfícies, testar a capacidade de descontaminação de agentes desinfetantes, controlar a presença de patógenos em ambientes hospitalares, entre outras funções.

Objetivos

- Identificar a presença de bactérias no ambiente.

Materiais

- Ágar Nutriente;
- Swab estéril para coleta de amostras;
- Solução salina 0,85%;
- Incubadora.

Metodologia

Para a realização do isolamento é preciso escolher o local onde serão coletadas as amostras, por exemplo, maçaneta da porta, sola de sapato, notas de dinheiro, ar condicionado etc. Deve-se umedecer o *swab* em salina e passar sobre a superfície de interesse. Inocular o conteúdo do *swab* sobre o meio de cultura Ágar Nutriente e incubar a 37°C por 24h, como demonstrado na figura 3.

Figura 3. Etapas do isolamento de microrganismos. **Fonte:** acervo próprio.

Questões para Estudo

1. Como ocorre o crescimento de colônias bacterianas nas placas de ágar nutriente?
2. Como é realizada a contagem de microrganismos em unidades formadoras de colônias (UFC)?

Como Aplicar nas Escolas?

Materiais

- Meio de cultura (vide métodos alternativos, página 51);
- Haste para coleta de amostras (vide métodos alternativos, página 52);
- Solução salina caseira (vide métodos alternativos, página 52) ou soro fisiológico;
- Estufa (vide métodos alternativos, página 52);

Procedimento

1. Preparar um meio de cultura conforme os métodos alternativos, página 52);
2. Preparar uma haste para coleta de amostras de acordo com os métodos alternativos, página 52;
3. Escolher o local onde serão colhidas as amostras (chave, notas de dinheiro etc.);
4. Umedecer a ponta de algodão da haste de madeira com o soro fisiológico ou a solução salina caseira e passar sobre a superfície de interesse;
5. Aplicar o conteúdo da haste sobre o meio de cultura produzido e incubar a 37°C por 24 horas, como demonstrado na figura 3.

Referências

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. **Módulo 5: Tecnologias em Serviços de Saúde: descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos.** Brasília: Anvisa, 2013.

KOSCOVA J.; HURNIKOVA Z.; PISTL J. Degree of Bacterial Contamination of Mobile Phone and Computer Keyboard Surfaces and Efficacy of Disinfection with Chlorhexidine Digluconate and Triclosan to Its Reduction. **International journal of environmental research and public health.** Vol. 15 (10):2238. 12 Oct. 2018.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica.** 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

Análise Microbiológica da Água

Introdução

Aproximadamente 1,6 milhões de pessoas no mundo morrem devido a água contaminada associada à saneamento básico deficiente por ano. Nem sempre é possível perceber que a água não é potável somente pela visão ou olfato. Assim, a análise laboratorial e o controle microbiológico são medidas imprescindíveis para evitar que a água seja veículo de transmissão de microrganismos que comprometem a saúde (YAMAGUCHI et al., 2013).

A água potável deve estar livre de microrganismos patogênicos e de bactérias que evidenciam contaminação fecal. Como indicadores, as bactérias de referência eleitas são as do grupo coliforme. Essa escolha deve-se a fatores como a identificação em fezes de seres humanos; a detecção e quantificação por técnicas simples e economicamente viáveis, em qualquer tipo de água; a relação direta entre sua concentração na água contaminada com o grau de contaminação fecal; a capacidade de sobreviver por mais tempo na água que as bactérias patogênicas intestinais; e a resistência maior aos agentes tensoativos e agentes desinfetantes do que bactérias patogênicas. A *Escherichia coli (E. coli*) é a principal representante desse grupo (FUNASA, 2013).

Coliformes totais são bacilos gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, oxidase-negativos, capazes de crescer na presença de sais biliares ou agentes tensoativos que fermentam a lactose com produção de ácido, gás e aldeído a 35,0 ± 0,5 °C em 24-48 horas, e que podem demonstrar atividade da enzima ß-galactosidase. As bactérias dos gêneros *Escherichia, Citrobacter, Klebsiella* e *Enterobacter* correspondem a maioria desse grupo. Coliformes termotolerantes são um subgrupo das bactérias do grupo coliforme que fermentam a lactose a 44,5 ± 0,2 °C em 24 horas; tendo como principal exemplar a E. coli, de origem exclusivamente fecal (FUNASA, 2013).

A Portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde (Portaria de Potabilidade) para assegurar a potabilidade da água para consumo humano, determina que seja averiguada a ausência de coliformes totais e *E. coli* e determinada a contagem de bactérias heterotróficas (FUNASA, 2013).

Objetivos

- Verificar a presença de coliformes na amostra de água.

Materiais

- Amostra de água;
- Alça bacteriológica;

- Tubo de Durhan;
- Tubo de ensaio;
- Caldo lactosado;
- Eosina Azul de Metileno (EMB);
- Diluente água peptonada;
- Ponteira;
- Pipetas graduadas;
- Placas de Petri.

Metodologia

1) Procedimento presuntivo

Preparar nove tubos de ensaio com 9 mL de caldo lactosado e com tudo de Duhran invertido e dois tubos com 9 mL de água peptonada. Com o auxílio de uma pipeta inocular 1 mL da amostra de água em 3 tubos de caldo lactosado. Em seguida, diluir a amostra de água em água peptonada nas concentrações de 1:10 e 1:100. Para cada diluição, adicionar 1 mL em 3 tubos com caldo lactosado (figura 4). Agitar os tubos e incubar à 37 °C durante 24, 48 e 72 horas.

Se ocorrer a turvação do meio contido nos tubos, o crescimento da bactéria é confirmado, sendo o resultado positivo. Quanto mais o crescimento avançar nas diluições, maior a contaminação das amostras de água.

Os tubos de Durhan são cilíndricos e de pequeno volume, colocados invertidos no meio líquido do tubo de cultura. Caso a bactéria seja fermentadora, haverá a produção de gás, deslocando o líquido total ou parcialmente. Se não houver formação de gás, a bactéria não é fermentadora ou não ocorreu crescimento bacteriano.

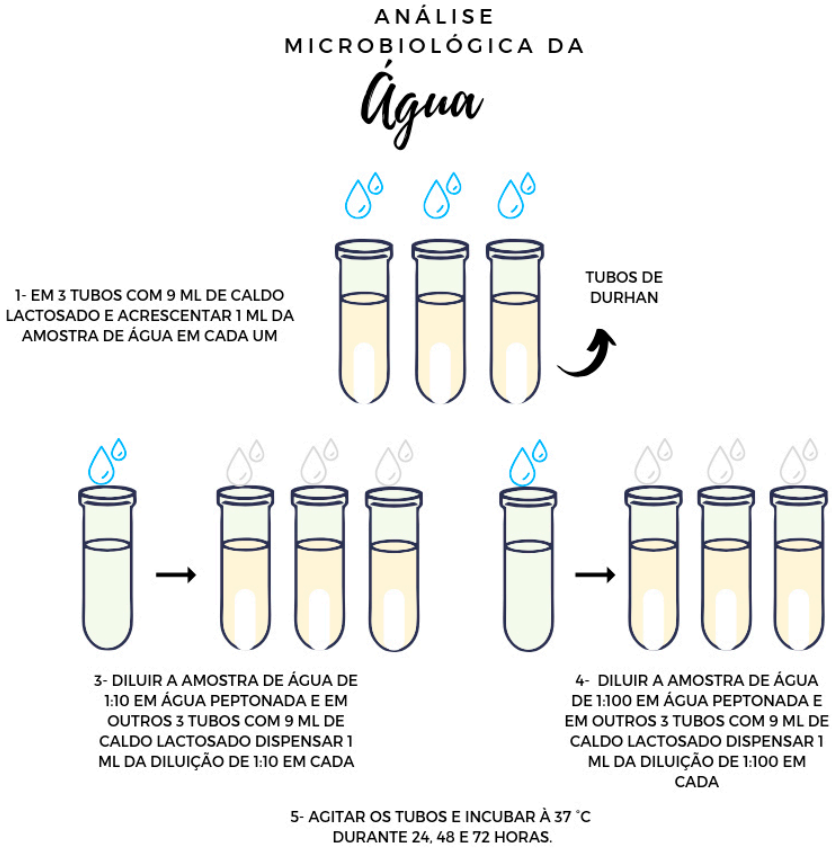

Figura 4. Etapas da preparação do teste presuntivo de análise microbiológica da água.**Fonte:** acervo próprio.

2) Diferenciação de bactérias do grupo coliforme

Inocular a amostra analisada em ágar EMB, um meio para diferenciação, ligeiramente seletivo, utilizado para identificar bacilos entéricos gram-negativos (enterobactérias e outros bastonetes gram-negativos). Incubar as placas invertidas de 24 a 48 horas à 37 °C.

Os coliformes produzem colônias pretas-azuladas, enquanto as colônias de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. são incolores ou têm uma cor âmbar transparente. As colônias de *E. coli* poderão apresentar um reflexo verde metalizado característico, devido à rápida fermentação da lactose (figura 5).

Figura 5. Apresentação da ***E. coli*** em meio EMB.**Fonte:** acervo próprio.

Acesse o vídeo "CESSA – Apresentação de analises microbiológicas" enviado no dia 3 de julho de 2019 no canal do Youtube "CIAR UFG" para mais detalhes sobre a análise microbiológica da água: https://www.youtube.com/watch?v=oK6hzSa7wj0&feature=youtu.be.

Questões para Estudo

1. Quais são os critérios para avaliar a qualidade da água?
2. Por que as bactérias do grupo coliforme foram eleitas como indicadores da qualidade da água?

Como Aplicar nas Escolas?

Materiais

- Água filtrada;
- Amostra de água;
- Frutas;
- Estufa (vide métodos alternativos, página 52);
- Tubos.

Procedimento

1. Preparar um caldo de cultura bacteriana caseiro com água filtrada e frutas (maçã, uva, laranja, morango etc.). Utilizar diferentes tipos de frutas, para manter o pH neutro ou próximo do neutro. Colocar as frutas na água para descansar por 1 hora. Dissolver um tablete de caldo de carne com água quente e acrescentar na mistura de água com frutas.
2. Em seguida, acrescentar um 1 mL da amostra de água que vai ser analisada.
3. Incubar na estufa caseira à 37 °C durante 24 horas;

Referências

Brasil. Fundação Nacional de Saúde. **Manual prático de análise de água.** 4. ed. Brasília: Funasa, 2013. 150 p.

YAMAGUCHI, M. U. et al. Qualidade microbiológica da água para consumo humano em instituição de ensino de Maringá-PR. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, 2013; 37(3):312-320.

Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos: Método de Disco-Difusão

Introdução

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos é uma das principais funções do laboratório de microbiologia clínica. Esse teste representa uma importante ferramenta de orientação para a escolha mais adequada da terapia antimicrobiana, além de servir para o monitoramento da evolução da resistência bacteriana e auxiliar na implantação de medidas de controle para bactérias multirresistentes (ANVISA, 2008).

Em 1966, Bauer et al idealizaram o método de disco-difusão, um dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos mais empregados nos laboratórios de microbiologia. Esse método tem como princípio a difusão, através do ágar, de um antimicrobiano impregnado em um disco de papel-filtro. A partir dessa difusão, pode haver a formação de um halo de inibição do crescimento bacteriano, cujo diâmetro é inversamente proporcional à concentração inibitória mínima do antimicrobiano testado. Esse teste é qualitativo, portanto, viabiliza a interpretação da amostra bacteriana em suscetível, intermediária ou resistente ao antimicrobiano, de acordo com os critérios do *"The Clinical & Laboratory Standards Institute"* (CLSI) (SEJAS, 2003; OPLUSTIL et al, 2010).

Objetivos

- Aprender a técnica do antibiograma;
- Observar a sensibilidade de microrganismos aos diferentes antibióticos.

Materiais

- Alça bacteriológica;
- Cultura de microrganismo isolado em meio não seletivo com no máximo 24h de crescimento;
- Discos de antibióticos comerciais;
- Duas placas de Petri contendo meio para antibiograma (Ágar Muller-Hinton);

- Escala de McFarland;
- Pinça esterilizada;
- Solução salina 0,85%;
- Swabs estéreis;
- Régua.

Metodologia

1) Preparo do inóculo

Consiste em preparar uma suspensão bacteriana-padrão equivalente a 0,5 da escala de McFarland que corresponde aproximadamente a 15 x 108/UFC/mL e que pode ser obtido pelo método da suspensão direta ou método de crescimento (figura 6).

a) Método da suspensão direta

Esse método é habitualmente utilizado para culturas com no máximo 24 horas de crescimento provenientes de meios não seletivos tais como, ágar sangue, chocolate, CLED (do inglês, ágar de cistina lactose deficiente em eletrólitos) e meios cromogênicos utilizados no isolamento primário. É o método recomendado para *Haemophilus* spp., *Streptococcus* spp., *Neisseria gonorrhoeae*, podendo também ser utilizado para bactérias de crescimento rápido como como enterobactérias, estafilococos e enterococos.

Com o auxílio de um fio bacteriológico tocar na superfície de três a quatro colônias com a mesma morfologia e suspender em 3 a 4 mL de solução fisiológica estéril, caldo Mueller-Hinton ou caldo TSB.

Comparar o inóculo ajustado com a escala de McFarland colocando os tubos lado a lado contra um cartão de fundo preto com tiras brancas. Os tubos devem ter a mesma dimensão/diâmetro para serem comparados. Se a turbidez ultrapassar a escala, ajustar com solução fisiológica estéril.

2) Inoculação nas placas

Deixar as placas de ágar em temperatura ambiente antes do uso (não expor a temperaturas elevadas) e não utilizar placas que contenham água de condensação. Deixar as placas secarem com a tampa semiabertas dentro da cabine de segurança.

Dentro de 15 minutos após o ajuste do inóculo, proceder à semeadura introduzindo um swab estéril na suspensão padronizada (figura 6). Comprimir o swab na parede interna do tubo para retirar o excesso do inóculo e semear na superfície do ágar apropriado em três direções diferentes. Deixar a placa tampada por 5 minutos e não mais de 15 minutos à temperatura ambiente, para que o inóculo seja completamente absorvido pelo ágar antes de aplicar os discos.

3) Aplicações dos discos

A distância entre um disco e outro deve ser no mínimo de 24 mm. Colocar no máximo 12 discos em placas de 150 mm e não mais que 5 discos em placas de 90 mm.

Após a colocação dos discos, pressionar levemente a superfície de cada disco com o auxílio de uma pinça.

Uma vez o disco colocado, não remover do lugar, pois a difusão da droga é imediata.

4) Incubação das placas

Incubar as placas invertidas em, no máximo, 15 minutos da colocação dos discos.

A temperatura máxima da estufa deve estar aferida em 35 ± 2°C e de 33-35 para teste com discos de oxacilina e cefoxitina para *Staphylococcus* spp.

O tempo de incubação deve ser de 16 a 18 horas, com exceção de oxacilina e vancomicina para *Staphylococcus* spp. e vancomicina para Enterococcus spp., que deve ser de 24 horas.

As bactérias são incubadas em estufa aeróbia, com exceção de *Haemophilus* spp., *Streptococcus* spp. e *N. gonorrhoeae*, que devem ser incubados em estufa de CO_2.

5) Leitura das placas

Considerar o halo de inibição a partir do ponto onde não é observado crescimento bacteriano, a olho nu.

As placas de Mueller-Hinton não suplementado, ágar HTM e ágar GC devem ser lidas sobre uma superfície escura com luz posicionada diretamente sob a placa. O diâmetro do halo de inibição é lido com o auxílio de uma régua sobre o fundo da placa.

Os halos de inibição para cada antimicrobiano testado devem ser interpretados nas categorias sensível, intermediário ou resistente, de acordo com os critérios estabelecidos nas tabelas do CLSI M100 (revisado anualmente).

Figura 6. Etapas do teste de sensibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco-difusão.**Fonte:** acervo próprio.

Questões para Estudo

1. Como ocorre o crescimento das bactérias ao redor dos discos de antibiótico?
2. Explique como as bactérias adquirem resistência aos antibióticos.

Como Aplicar nas Escolas?

Materiais

- Água descontaminada;
- Alho (ou açafrão, cravo da índia, canela, gengibre etc.);
- Estufa caseira;
- Haste para coleta de amostras;
- Meio de cultura;
- Tubo.

Procedimento

1. Preparar um meio de cultura, de acordo com o indicado no tópico métodos alternativos, página 51.
2. Preparar uma suspensão bacteriana: colher com a haste para coleta de amostras, descrita em métodos alternativos (página 52), colônias de bactérias e introduzindo em um tubo com água (ferver água filtrada por 15 minutos e deixar esfriar);
3. Preparar outra haste para coleta de amostras;
4. Introduzir a haste na suspensão e ao retirar comprimir a ponta de algodão na parede do tubo para retirar o excesso. Aplicar no meio de cultura em três direções diferentes.
5. Substituir os discos de antimicrobianos comerciais por alimentos que apresentem poder antimicrobiano como o alho, açafrão, cravo da índia, canela, gengibre, entre outros. Dispense o alimento escolhido sobre o meio de cultura. Cobrir o meio de cultura com uma tampa de recipiente de conserva de diâmetro maior.
6. Incubar na estufa caseira conforme os métodos alternativos página 31, 35 ± 2°C por 16 a 18 horas.
7. Observar se houve inibição do crescimento bacteriano.

Referências

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Módulo 5: Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos.** Brasília: Anvisa, 2008.

SEJAS, L. M. et al. Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** vol.39 no.1. Rio de Janeiro, 2003.

OPLUSTIL, C. P.; et al. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica.** 3ª ed. São Paulo:Sarvier, 2010.

Isolamento e Identificação de *Staphylococcus* spp.

Introdução

O gênero *Staphylococcus* spp. possui esse nome por apresentar uma morfologia que se assemelha a cachos de uvas, embora possa apresentar outras formas, como células únicas, aos pares ou cadeias curtas. São cocos Gram-positivos, isolados aos pares, tétrades, cadeias curtas ou cachos irregulares. A maioria dos estafilococos são, imóveis, anaeróbios facultativos, capazes de crescer em meios com altas concentrações de sal. São bactérias mesófilas (temperaturas entre 18 °C e 40 °C) e não esporuladas. Colonizam a pele e mucosas de seres humanos e podem causar vários desfechos clínicos, como infecções de pele, ossos, tecidos moles, trato urinário e infecções oportunísticas. Todos os estafilococos são catalase positivo, entretanto, apenas o *Staphylococcus aureus* apresenta positividade para os testes de coagulase e DNAse (MURRAY et al., 2009).

Objetivos

- Compreender os passos para o isolamento e a identificação dos Staphylococcus.

Materiais

- Ácido clorídrico a 37%;
- Ágar DNAse;
- Ágar manitol salgado (7,5% NaCl);
- Ágar Mueller Hinton com discos de novobiocina contendo 5 µg;
- Ágar nutriente;
- Alça bacteriológica;
- Amostra biológica (swab da nasofaringe);
- Lâminas e lamínulas;
- Peróxido de hidrogênio a 3% (10V);
- Plasma;
- Salina;
- *Swab*.

Metodologia

1) Coleta da amostra

Remover o excesso de secreção ou exsudato nasal. Inserir, delicadamente, um swab fino umedecido com solução salina através do nariz até a nasofaringe. Fazer movimentos rotatórios por 10 a 15 segundos.

2) Semeadura

Inocular a amostra em ágar manitol por estrias através de esgotamento da alça de platina. Incubar a placa inoculada à 35 ± 2ºC por 24 horas. Após incubação, observar as placas. Caso não haja crescimento reincubar por mais 24h.

3) Leitura dos resultados

O ágar manitol salgado é um meio de cultura seletivo, pela alta concentração de cloreto de sódio (NaCl 7,5%) e diferencial, pela presença de manitol, que ao ser metabolizado pela bactéria altera a cor do indicador de pH vermelho de fenol, também presente no meio. A degradação do manitol resulta na produção de ácidos havendo, então, uma mudança de coloração de vermelho rosado para amarelo.

Caso seja observado crescimento bacteriano no ágar manitol salgado, as bactérias são do gênero Staphylococcus spp., pois são as únicas que resistem à elevada concentração de sal. Entre as espécies desse gênero, apenas o *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) fermenta manitol, portanto, produz colônias amareladas rodeadas por uma zona amarela. Essa característica diferencia o *S. aureus* de outras espécies, como *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*, cujo crescimento não altera a cor do meio e produz colônias brancas.

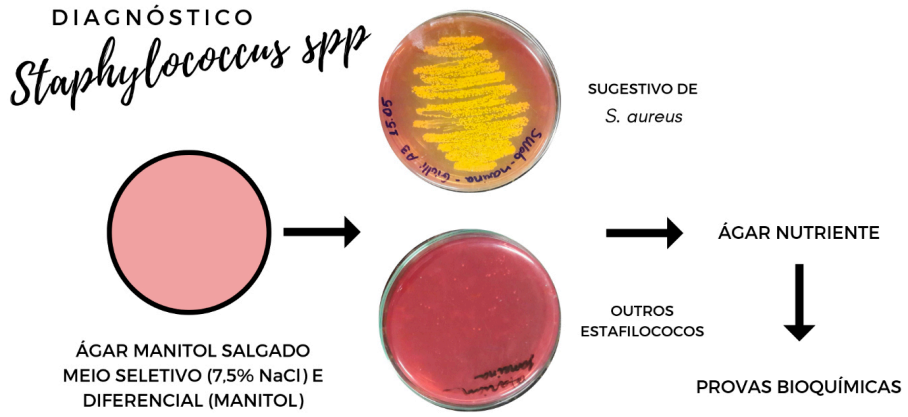

Figura 7. Etapas de identificação de ***Staphylococcus*** spp. **Fonte:** acervo próprio.

4) Provas adicionais

Após o crescimento em ágar manitol salgado, o isolamento de colônias é feito com auxílio de alça bacteriológica em ágar nutriente, pois o excesso de sal pode interferir nos resultados.

4.1) Prova da catalase

A prova se baseia na decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, tendo então formação de gás (bolhas). Estafilococos são catalase positivo (Figura 8). Em uma lâmina de vidro colocar uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%, em seguida, passar a alça bacteriológica sobre as colônias presentes no meio de cultura e aplicar sobre a gota em movimentos circulares.

4.2) Prova da coagulase

4.2.1) Teste da coagulase em lâmina

A maioria das cepas de *Staphylococcus aureus* possui a coagulase ligada (ou fator aglutinante) "clumping factor" na superfície da parede celular, que reage com o fibrinogênio do plasma causando a coagulação dele.

Colocar duas gotas de salina em uma lâmina; Emulsionar uma colônia isolada a ser testada; Colocar uma gota de plasma e misturar com um palito de plástico ou madeira; Observar se há aglutinação em 10 segundos; não se pode executar este teste a partir de um ágar com grande concentração de sal como ágar manitol.

4.2.2) Teste da coagulase em tubo

Este teste baseia-se na presença da coagulase livre que reage com um fator plasmático formando um complexo que atua sobre o fibrinogênio formando a fibrina. O teste é melhor efetuado se: adicionar 0,1 mL de caldo BHI, incubado por uma noite, com colônia suspeita a um tubo de ensaio com 0,5 mL de plasma; incubar por 4 horas à 35°C em estufa ou banho maria; a formação do coágulo é observada pela inclinação suave do tubo de ensaio a 90 graus da vertical. Um método alternativo é a emulsificação desta mesma colônia suspeita em um 0,5 plasma e incubado da mesma forma. Qualquer coágulo indica uma prova positiva, porém não confundir com precipitados ou floculação. O melhor plasma a ser usado é o de coelho com EDTA, não devendo ser usado o plasma humano vindo do banco de sangue.

A coagulase é considerada um fator de virulência da bactéria, pois os coágulos formados "camuflam" o microrganismo do sistema imune do hospedeiro. O *S. aureus* é coagulase positivo (Figura 8).

4.3) Prova da DNAse

Este teste consiste na inoculação de colônias em meio contendo DNA, (*DNAse test agar*) obtido comercialmente. Adicionar ao meio original azul de ortotoluidina na concentração de 0,1%; o meio adquire uma coloração azul intensa. Incubar a 35°C por 24 horas. Uma coloração rósea característica ao redor das colônias produtoras de DNAse indica a positividade da prova. O meio adicionado com corante demonstra uma melhor facilidade na leitura, e permite o repique da amostra positiva para o teste de sensibilidade aos antimicrobianos, evitando que se retorne à placa original onde nem sempre as colônias estão bem isoladas.

Outra maneira de realizar esse teste é semeando a amostra no meio DNAse, sem adicionais, e após o período de incubação utilizar HCl 37%, para a revelar a presença ou não do halo. O *S. aureus* apresenta positividade para esse teste (Figura 8).

4.4) Teste de resistência à novobiocina

A cepa é semeada de maneira semelhante ao antibiograma em placa de Muller Hinton acrescida de um disco teste de novobiocina contendo 5 µg. As amostras resistentes mostram zonas de inibição de 6 a 12 mm, enquanto as susceptíveis apresentam halos de 16 mm ou mais. Esse teste é realizado para diferenciar as espécies *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*. A espécie *S. saprophyticus* é resistente a novobiocina, enquanto o *S. epidermidis* é sensível (Figura 8).

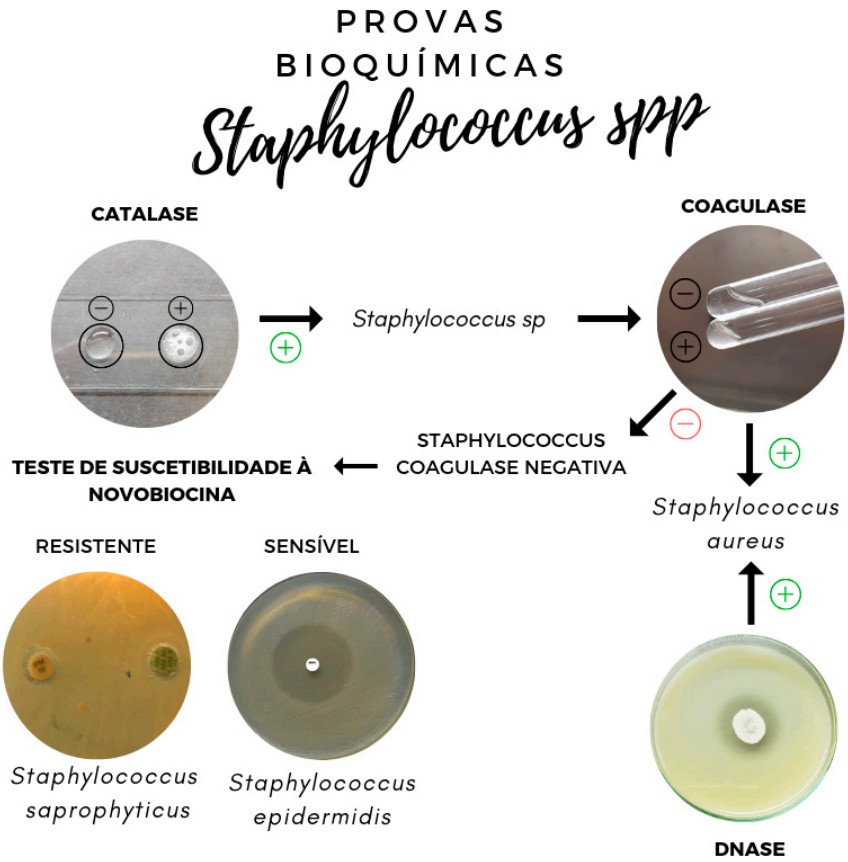

Figura 8. Provas bioquímicas para identificação de ***Staphylococcus*** spp. **Fonte:** acervo próprio.

Questões para Estudo

1. xplique por que o Ágar Manitol é seletivo e diferencial.
2. Por que o Ágar Manitol fica amarelo após o crescimento dos *S. aureus*?
3. Qual o nome do indicador de pH que contém no Ágar Manitol Salgado?

Como Aplicar nas Escolas?

Materiais

- Meio de cultura (vide métodos alternativos, página 51);
- Estufa (vide métodos alternativos, página 52);
- Palito de picolé;
- Haste para coleta de amostras (vide métodos alternativos, página 52);
- Lâmina;
- Água oxigenada 10 volumes.

Procedimento

1. Preparar um meio de cultura, conforme os métodos alternativos, página 51;
2. Colher com palito de picolé as amostras da orofaringe (tonsilas) ou da mucosa oral;

3. Após a colheita, semear a amostra no meio de cultura com a haste para coleta de amostras;
4. Incubar a 37 °C por 24 horas;
5. A partir do crescimento bacteriano é possível realizar apenas uma das três provas bioquímicas, a da catalase. Para isso, em uma lâmina colocar uma gota de água oxigenada 10 volumes, em seguida, passar o palito sobre as colônias presentes no meio de cultura e aplicar sobre a gota em movimentos circulares. *Staphylococcus* spp. são positivos para catalase, ou seja, produzem gás (bolhas).

Referências

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Módulo V - Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica.** Brasília: Anvisa, 2004.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S; MICHAEL, A.P. **Microbiologia Médica.** 6a Ed. Editora Elsevier, 2009.

OPLUSTIL, C.P. et al. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica.** 3. Ed. São Paulo: Sarvier, 2010.

Lavagem das Mãos

Introdução

A higienização das mãos é um procedimento simples e eficaz para reduzir a propagação de infecções. O termo "lavagem das mãos" foi substituído por "higienização das mãos", compreendendo a higienização simples, a higienização antisséptica, a fricção antisséptica e a antissepsia cirúrgica das mãos. Higienizar as mãos tem por finalidade a remoção de sujidade, suor, oleosidade, pelos, células descamativas e microbiota da pele, podendo interromper a transmissão de infecções disseminadas por contato (ANVISA, 2009).

Em 1938, as bactérias isoladas das mãos foram categorizadas por Price em transitórias e residentes. A microbiota residente é composta por bactérias com baixa virulência, aderidas às camadas mais profundas da pele e mais resistentes aos procedimentos de higienização. A microbiota transitória coloniza a camada superficial da pele, sobrevive por períodos curtos, consiste em sua maioria por microrganismos patogênicos e é removível pela higienização simples, por meio de fricção mecânica, com água e sabão (ANVISA, 2009).

A higienização envolve conceitos como: a assepsia é o conjunto de medidas adotadas para impedir a introdução de agentes patogênicos no organismo ou no ambiente; a antissepsia, consiste no uso de produtos (microbicidas ou microbiostáticos) sobre a pele ou mucosa com o objetivo de reduzir os microrganismos em sua superfície; a esterilização é o processo de eliminação ou destruição completa de todas as formas de vida microbiana, através de processos físicos ou químicos; a desinfecção é o processo que elimina todos os microrganismos ou objetos inanimados patológicos, com exceção dos endósporos bacterianos (não deve ser confundida com a esterilização, visto que não elimina totalmente todas as formas de vida microbiana); a limpeza consiste na remoção de materiais estranhos aos objetos (como sujeira) com água, podendo-se utilizar também algum tipo de detergente (a limpeza precede a desinfecção e a esterilização); e a descontaminação é um processo pelo qual um objeto tem removidos os microrganismos patológicos, tornando se seguro para ser manuseado pelos profissionais competentes (KALIL; COSTA, 1994; ANVISA, 2009).

Objetivos

- Observar o efeito de diferentes produtos antissépticos na higienização das mãos;
- Aprender a realizar o processo de higienização corretamente.

Materiais

- Ágar nutriente em tubo fundido;
- Algodão;
- Água estéril;
- Álcool 70%;
- Detergente;
- Gaze;
- Iodopovidona;
- Placa de Petri estéril

Metodologia

1. Escolher um voluntário;
2. Aplicar detergente em uma das mãos e esfregar com a gaze (usar apenas uma mão, não esfregar uma mão na outra);
3. Enxaguar o excesso com água estéril e com o auxílio do algodão absorver o que foi removido das mãos;
4. Liberar a amostra presente no algodão em uma placa de petri e adicionar o ágar nutriente fundido, utilizando a metodologia de Pouer Plate;
5. Incubar a placa semeada à 35 a 37 °C de 24 a 48 horas;
6. Repetir esse procedimento utilizando o álcool 70% e o iodopovidona;
7. Observar e comparar os resultados obtidos com cada um dos agentes antissépticos (figura 9).

Figura 9. Etapas do teste de eficiência de diferentes agentes antissépticos. **Fonte:** acervo próprio.

Questões para Estudo

1. Qual diferença entre agentes bactericidas e bacteriostáticos?
2. Qual produto usado no teste teve maior eficiência na higienização das mãos?
3. Como cada agente antisséptico (detergente, álcool 70% e iodopovidona) atuam na redução dos microrganismos?

Como Aplicar nas Escolas?

Materiais

- Água descontaminada (vide métodos alternativos, página 53);
- Álcool 70%;
- Algodão;
- Detergente;
- Gaze;
- Iodopovidona;
- Meio de cultura líquido (vide métodos alternativos, página 51);
- Tampa de metal de recipiente de conserva descontaminada (vide métodos alternativos, página 51).

Procedimento

- Escolher um voluntário;
- Aplicar detergente em uma das mãos e esfregar com a gaze (usar apenas uma mão, não esfregar uma mão na outra);
- Enxaguar o excesso com água descontaminada e com o auxílio do algodão absorver o que foi removido das mãos;
- Liberar a amostra presente no algodão na tampa de metal de recipiente de conserva e adicionar a mistura de meio de cultura ainda líquida, utilizando a metodologia de Pouer Plate;
- Incubar a placa semeada à 35 a 37 °C de 24 a 48 horas;
- Repetir esse procedimento utilizando o álcool 70% e o iodopovidona;
- Observar e comparar os resultados obtidos com cada um dos agentes antissépticos (figura 9).

Outra sugestão de atividade no artigo “Como ensinar microbiologia, com ou sem laboratório. 01 de junho de 2005. Disponível em: https://novaescola.org.br/conteudo/385/como-ensinar-microbiologia.

Referências

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Segurança do Paciente em Serviços de Saúde: Higienização das Mãos / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2009. 105p

KALIL, E. M. COSTA, A. J. F. Desinfecção e esterilização. Acta Ortop Bras 2(4) - Out/Dez, 1994.

Leitura de Lâminas de Ziehl-Neelsen

Introdução

O gênero *Mycobacterium* compreende bacilos aeróbios, imóveis, não formadores de esporos. A parede celular desses microrganismos é complexa e rica em lipídios, o que torna a superfície hidrofóbica. Esse gênero é resistente a soluções ácidas descorantes, apresenta crescimento lento (cerca de 8 semanas para detectar em culturas), são resistentes a detergentes e a alguns antibióticos (MURRAY, 2009).

A coloração de Ziehl-Neelsen baseia-se na supracitada capacidade das micobactérias resistirem a soluções ácidas descorantes devido à composição altamente lipídica da parede celular. Sendo assim, após um processo de coloração especial, a quente, uma vez coradas, não sofrem ação de descorantes fortes, como a solução de álcool-ácido. Deste modo, a fucsina de Ziehl cora todas as bactérias de vermelho e após a descoloração com álcool-ácido, somente os bacilos álcool-ácido resistentes (B.A.A.R.) conservarão esta cor. Em seguida cora-se o fundo com azul de metileno, criando um contraste nítido entre elementos celulares e outras bactérias (azuis) e os B.A.A.R (vermelhos) (Figura 10).

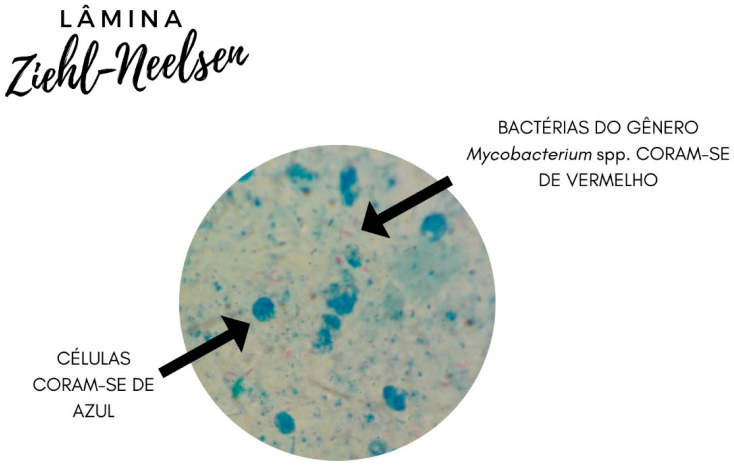

Figura 10. Microscopia demonstrando lâmina de Ziehl-Neelsen. **Fonte:** acervo próprio.

Objetivos

- Compreender o princípio da coloração de Ziehl-Neelsen;
- Analisar a lâmina e verificar a presença ou não de micobactérias.

Materiais

- Álcool-ácido a 1%;
- Amostra clínica (secreções do trato respiratório inferior, biópsias, tecidos, líquidos em geral e fezes);
- Azul de metileno a 10%;
- Fucsina de Ziehl-Neelsen;
- Óleo de imersão.

Metodologia

1. Preparo do esfregaço (espalhar a amostra com alça bacteriológica sobre a lâmina e fixar com calor, passando sobre chama do bico de Bunsen de 2 a 3 vezes até completa secagem do esfregaço);
2. Fixar pelo calor;
3. Cobrir com fucsina de Ziehl;
4. Aquecer a parte inferior da lâmina, até emissão de vapores;
5. Lavar com água corrente;
6. Cobrir o esfregaço com álcool-ácido 1% e deixar por 1 minuto;
7. Lavar com água corrente;
8. Cobrir com azul de metileno 10% e deixar por 2 minutos;
9. Lavar com água corrente;
10. Secar;
11. Observar ao microscópio óptico com objetiva de imersão (100x) (Figura 11).

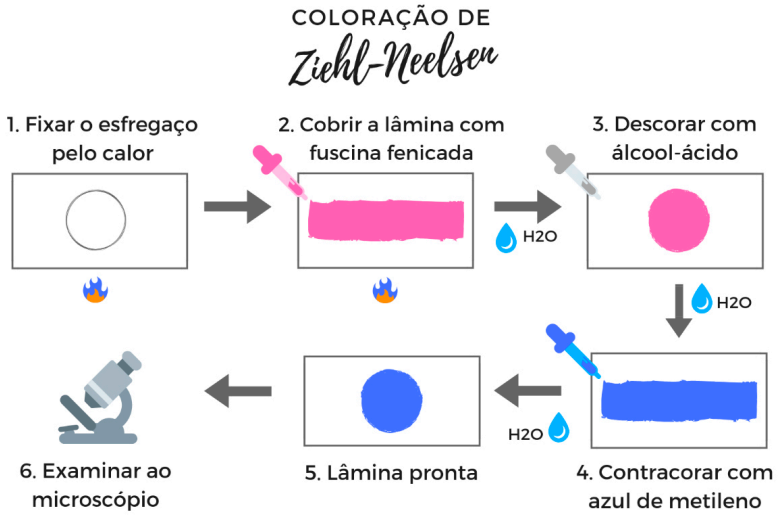

Figura 11. Etapas da coloração de Ziehl-Neelsen. **Fonte:** acervo próprio.

Questões para Estudo

1. Explique detalhadamente a composição da parede celular das micobactérias.
2. Por que as micobactérias resistem aos métodos de coloração comuns?

Referências

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. **Microbiologia médica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

OPLUSTIL, C.P. et al. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica**. 3. Ed. São Paulo: Sarvier, 2010.

Isolamento de Enterobactérias

A família *Enterobacteriaceae* compreende um vasto grupo heterogêneo de bactérias de grande importância médica. São bastonetes ou cocobacilos Gram-negativos, distribuídos amplamente pela natureza (ubíquos) e fazem parte da microbiota normal da maioria dos animais, inclusive do homem. Podem causar diversas doenças em humanos, como diarreia,

pneumonia, infecção do trato urinário (ITU), infecção do trato respiratório (ITR), bacteremias, meningite e dentre outras.

Apresentam motilidade variável, anaeróbios facultativos e não esporulados. São positivas para o teste da catalase, fermentam a glicose com ou sem produção de gás, são oxidase negativos, reduzem nitrito a nitrato, possuem exigências nutricionais simples, crescem de forma satisfatória em meios seletivos e não seletivos. São bactérias resistentes a sais biliares e apresentam na parede celular seu principal antígeno, o lipopolissacarídeo (LPS), que é composto por três partes: o antígeno O (mais externo), um cerne polissacarídeo (mais central) e o lipídeo A (mais interno) e com atividade de endotoxina (MURRAY et al., 2009).

Objetivos

- Realizar o isolamento e a diferenciação entre as espécies de Enterobactérias;
- Compreender os princípios dos meios de cultura e os testes bioquímicos utilizados.

Materiais

- Ágar Citrato de Simmons (CITRATO);
- Ágar Fenilalanina (FA);
- Ágar MacConkey;
- Ágar Sulfeto de Hidrogênio, Indol e Motilidade (SIM);
- Ágar Tríplice-Ferro (TAF);
- Alça bacteriológica;
- Amostra de colônias isoladas de enterobactérias;
- Bico de Bunsen;
- Caldo Ureia de Stuart (UREIA);
- Caldo Vermelho de Metila (VM).

Metodologia

A metodologia para isolar e identificar enterobactérias é a mesma para os diferentes meios que podem ser utilizados: com a alça bacteriológica colher colônias de enterobactérias, estriar nas placas e inocular nos tubos contendo os meios de cultura, e incubar a 37 °C por 24 horas.

1) Ágar MacConkey

O ágar MacConkey é meio de cultura seletivo para Enterobactérias por conter sais biliares e cristal violeta (inibidores de Gram-positivas) e diferencial pela presença de lactose na composição. As bactérias lactose positivas crescem no ágar com a coloração rosada ou avermelhada das colônias, enquanto as negativas para lactose apresentam colônias incolores, uma vez que não fermentam a lactose e sim a peptona, convertendo-a em amônia (Figura 12).

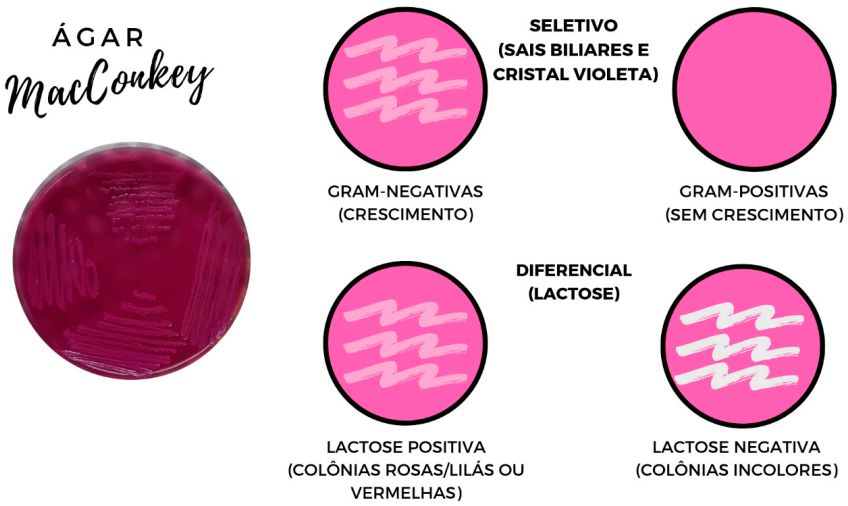

Figura 12. Isolamento de enterobactérias em Ágar MacConkey. **Fonte:** acervo próprio.

2) Ágar Tríplice-Ferro (TAF)

Esse meio de cultura é composto por três açúcares: lactose, sacarose e glicose. O indicador de pH vermelho de fenol, também presente na composição, altera a coloração do meio de vermelho para amarelo caso a bactéria fermentar algum dos açucares. Por meio deste procedimento podem ser avaliados três parâmetros: fermentação de carboidratos, produção de sulfeto de hidrogênio (meio fica enegrecido) e produção de gás (forma-se espaço no tubo). Por convenção a leitura da prova é realizada do ápice para a base. **A**= ácido, **K**= alcalino (Figura 13).

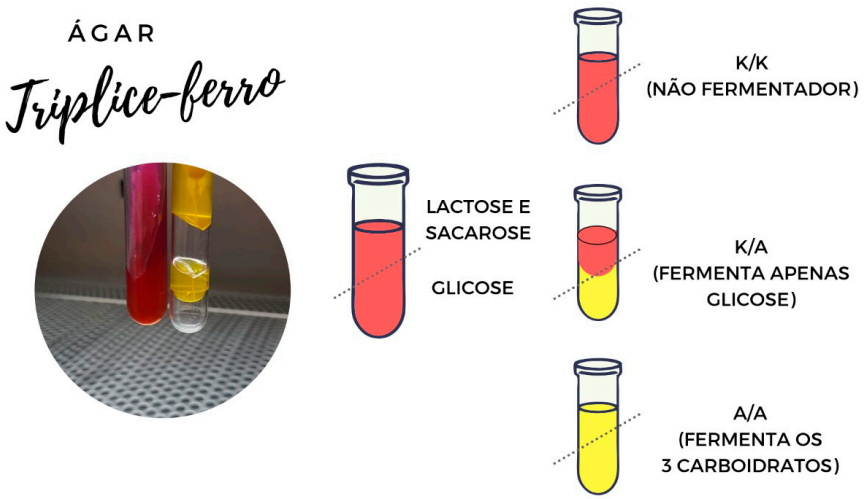

Figura 13. Esquema ilustrativo do Ágar Tríplice-Ferro (TAF). **Fonte:** acervo próprio.

3) Ágar Sulfeto de Hidrogênio, Indol e Motilidade (SIM)

O SIM é um meio de cultura semi-sólido que permite avaliar as seguintes características nas enterobactérias: síntese da enzima triptofanase, produção de sulfeto de hidrogênio e a motilidade. Bactérias que sintetizam a enzima triptofanase são capazes de metabolizar o triptofano em indol, evidenciado pela formação de um anel vermelho na superfície do meio após a adição do reativo de KOVACS. A produção de sulfeto de hidrogênio se apresenta por meio da coloração enegrecida e a motilidade pela turbidez (Figura 14).

Figura 14. Esquema ilustrativo do Ágar Sulfeto de Hidrogênio, Indol e Motilidade. **Fonte:** acervo próprio.

4) Ágar Citrato de Simmons (CITRATO)

Meio de cultura utilizado para identificação de bactérias que utilizam o citrato com única fonte de carbono. O meio tem a coloração inicial verde, se a bactéria metabolizar o citrato presente no meio, ele ficará azul devido ao indicador azul de bromotimol. A mudança de cor ocorre pela alcalinização do meio (Figura 15).

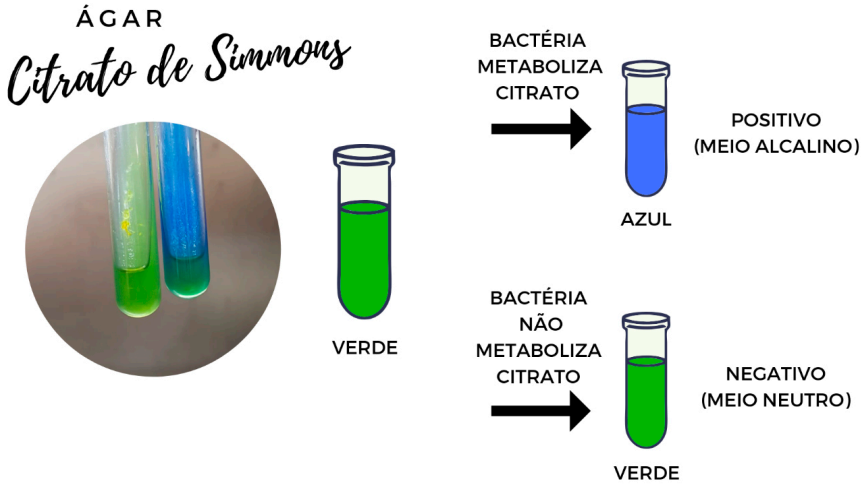

Figura 15. Esquema ilustrativo do Ágar Citrato de Simmons. **Fonte:** acervo próprio.

5) Caldo Ureia de Stuart (UREIA)

Esse meio é utilizado para avaliar se a bactéria é produtora da enzima urease. A ureia presente no meio é degradada pela enzima urease em duas moléculas de amônia. A amônia formada alcaliniza o meio. A mudança de pH é observada conforme a cor original âmbar se tornar rosa em função do indicador vermelho de fenol (Figura 16).

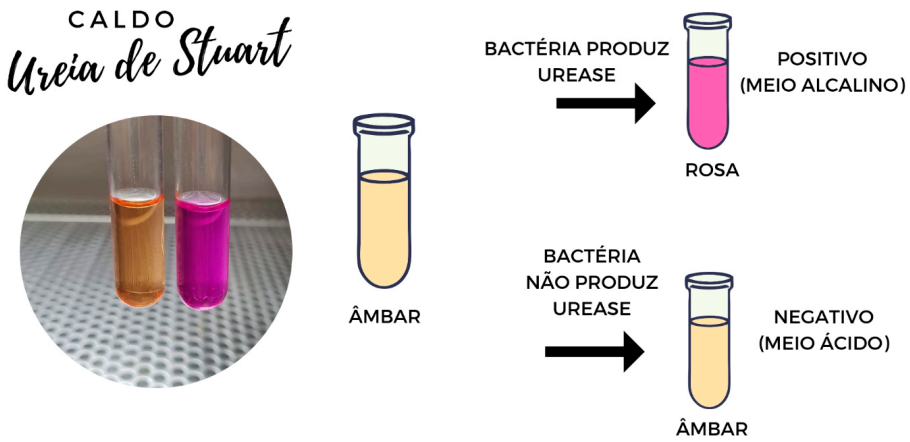

Figura 16. Esquema ilustrativo do Ágar Citrato de Simmons. **Fonte:** acervo próprio.

6) Ágar Fenilalanina (FA)

Meio utilizado para diferenciação de bacilos entéricos quanto à capacidade de produzir ácido fenilpirúvico a partir da desaminação da fenilalanina por ação enzimática. O meio é incolor e caso os bacilos entéricos forem FA positivos, o meio apresentará uma coloração esverdeada na superfície, após a adição do cloreto férrico (Figura 17).

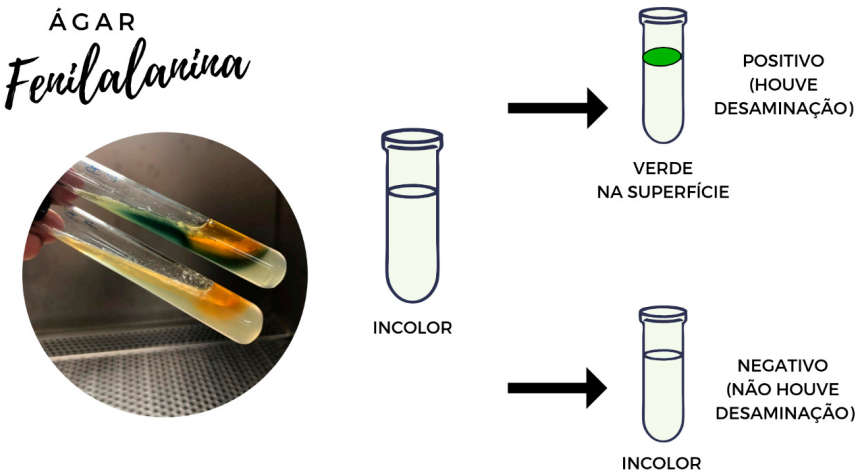

Figura 17. Esquema ilustrativo do Ágar Fenilalanina. **Fonte:** acervo próprio.

7) Caldo Vermelho de Metila (VM)

Esse teste serve para identificar espécies bacterianas fortes fermentadoras, a partir da glicose. O meio é amarelo e possui o indicador de pH vermelho de metila. Se a bactéria for uma forte produtora de ácidos e o pH ficar abaixo de 4,4 (ponto de viragem), há alteração da cor inicial para vermelho (Figura 18).

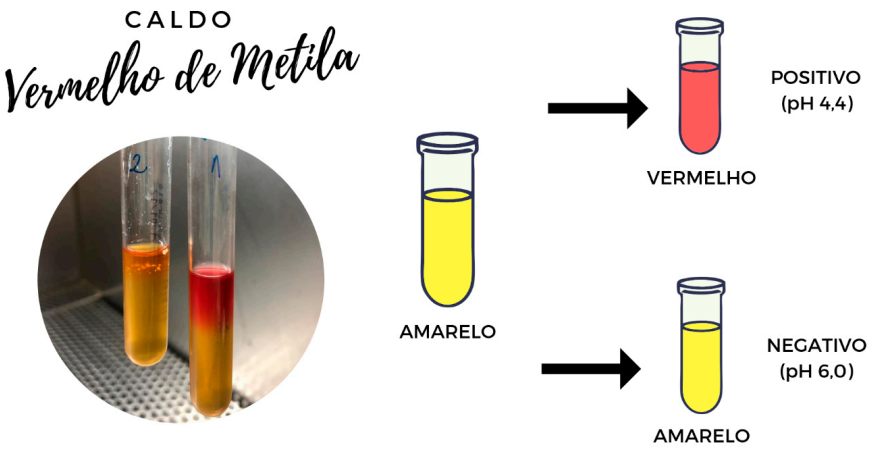

Figura 18. Esquema ilustrativo do Caldo Vermelho de Metila. **Fonte:** acervo próprio.

Questões para Estudo

1. Explique por que o Ágar MacConkey é seletivo e diferencial?
2. Explique o princípio dos meios utilizados para identificação das enterobactérias.

Referências

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. **Microbiologia médica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

OPLUSTIL, C.P. et al. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica**. 3. Ed. São Paulo: Sarvier, 2010.

Métodos Alternativos

Meio de Cultura Caseiro:

Materiais

1. Tampas de metal de recipiente de conserva;
2. Panela de pressão;
3. Líquido de limpeza;
4. Caldo de carne;
5. Gelatina incolor e sem sabor;
6. Água.

a) Limpeza do material

Em uma panela de pressão, coloque tampas de metal de recipientes de conserva, juntamente com água e um pouco de líquido Extran (cerca de duas colheres para um litro de água). Após atingir a pressão deixar entre 20 a 30 minutos. Em seguida, transferir as tampas da panela de pressão para a estufa caseira, envolver as tampas no saquinho de papel e levar ao forno para secar por 15 minutos 180 °C.

A panela de pressão pode ser utilizada como aparelho alternativo para descontaminação, caso não seja possível o uso de autoclave. Porém, ela não atinge a temperatura e pressão da autoclave, portanto, os materiais devem ficar expostos ao calor por um tempo maior (BARBOSA; BARBOSA, 2010).

b) Preparação do meio de cultura

Em uma panela misturar um pacote de gelatina incolor e sem sabor, um tablete de caldo de carne e água (seguindo as instruções da embalagem). Levar ao fogo durante 15 a 20 minutos. Colocar a mistura nas tampas de recipiente de conserva, cobrir com outra tampa de diâmetro maior e vedar com plástico filme. Manter em geladeira por aproximadamente dois dias para resfriarem (CASSANTI, et al., 2008).

Haste para Coleta de Amostras:

Materiais

- Palitos de madeira;
- Algodão;
- Forno elétrico ou micro-ondas.

Palitos de madeira, semelhantes aos usados em churrasco, podem ser utilizados colocando um algodão na ponta. É importante que a haste seja descontaminada antes do uso, então coloque-a em forno elétrico por duas horas a 180 °C. O uso de hastes flexíveis com pontas de algodão comerciais (por exemplo, “cotonetes”) não é indicado, pois esses possuem substâncias germicidas.

Solução Salina Caseira:

Usar soro fisiológico ou ferver 1 xícara de água (idealmente filtrada) por 10 minutos, acrescentar 1 colher de chá de sal, mexer até dissolver e deixar esfriar.

Estufa Caseira:

Materiais

- Bacia de alumínio;
- Água;
- Lâmpada de 15w;
- Caixa de papelão;
- Termômetro.

Em uma caixa de papelão colocar uma bacia plástica com água, organizar um suporte (estante de metal), onde ficarão os meios de cultura, na base da bacia com água, colocar um termômetro (para controlar a temperatura da estufa). No topo da caixa, prender a lâmpada, para que ela aqueça o ambiente. Deve-se instalar um termostato na estufa para controlar a temperatura ambiente. Neste exemplo, a estufa laboratorial é substituída por uma estufa caseira (CASSANTI, et al., 2008). Quando o interior da estufa atinge uma determinada temperatura previamente regulada por termostato, por exemplo a 37 o C, a lâmpada se apaga.

À medida que a temperatura abaixa, o termostato liga a lâmpada novamente e assim sucessivamente (BARBOSA; BARBOSA, 2010).

Água:

Ferver a água filtrada em fogão convencional por 15 minutos para ter assim uma água menos contaminada, substituindo a água destilada.

Referências

SILVA, D. M. F.; NETO, L. S. Educação Dinamizada: Materiais Alternativos para o Ensino de Microbiologia. II CONEDU Congresso Nacional de Educação.

CASSANTI, A. C. et al. Microbiologia democrática: estratégias de ensino, aprendizagem e formação de professores. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, p. 1-23, 2008.

BARBOSA, F. H. F.; BARBOSA, L. P. J. L. Alternativas metodológicas em Microbiologia - viabilizando atividades práticas. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, vol. 10, núm. 2, 2010, pp. 134-143. Universidade Estadual da Paraíba. Paraíba, Brasil.

Modelo de relatório para as aulas práticas