



UNIVERSIDADE
DE ÉVORA

VIROLOGIA

Manual de apoio às
Sessões Laboratoriais

Fevereiro, 2017

Carlos Sinogas



ÍNDICE

PROCEDIMENTOS DE SEGURANÇA.....	3
Risco químico	3
Risco radiológico	3
Risco biológico.....	3
Regras.....	3
Planeamento.....	4
Procedimentos gerais.....	4
REGISTOS E RELATÓRIOS	5
Técnicas laboratoriais básicas em Microbiologia/Virologia.....	6
Meios de cultura.....	6
Esterilização	7
Tubos de cultura e Placas de Petri.....	7
Instrumentos para transferência de culturas	7
Câmaras de cultura.....	8
Frigorífico.....	8
Métodos de esterilização	9
Esterilização pelo calor.....	9
Esterilização por gases.....	10
Radiações	10
Filtração estéril	10
Desinfetantes e antissépticos.....	11
BACTERÍOFAGOS.....	12
PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	13
PIPETAGENS, SOLUÇÕES E DILUIÇÕES.....	13
CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO	18
CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO - 2	20
PREPARAÇÃO DE SUSPENSÃO VIRAL DE ALTO TÍTULO	23
ISOLAMENTO DE PLACA VIRAL	26
TITULAÇÃO DE SUSPENSÃO DE BACTERÍOFAGOS – FORMAÇÃO DE PLACAS	28
TITULAÇÃO DE SUSPENSÃO DE BACTERÍOFAGOS – DILUIÇÃO LIMITE	31
CURVA DE CRESCIMENTO DE UM BACTERÍOFAGO LÍTICO	33
REVELAÇÃO DE VÍRUS VEGETAL (TMV).....	36
ISOLAMENTO DE BACTERÍOFAGO SELVAGEM (trabalho final autónomo).....	38
APÊNDICE – Meios de cultura (fórmulas).....	41



PROCEDIMENTOS DE SEGURANÇA

O trabalho laboratorial em Virologia envolve três tipos principais de risco que importa considerar. O risco químico, o risco biológico e o risco radiológico. Quase todos os países têm regras próprias para abordar este tipo de questões que se colocam à experimentação laboratorial. Também os laboratórios onde o trabalho se desenvolve adoptam práticas apropriadas ao tipo de trabalho que aí se desenvolve.

Não se pretendendo discutir em detalhe os procedimentos de segurança legalmente exigíveis, apontam-se apenas algumas regras gerais e práticas laboratoriais a ser adoptadas.

Apesar de qualquer dos três riscos indicados colocarem problemas especiais, que requerem precauções de tipo diferente, existe um conjunto de precauções e procedimentos de segurança aplicáveis a todos e que deverão ser observados no trabalho laboratorial do âmbito da imunologia.

As regras que adiante se listam constituem um quadro geral no qual os procedimentos especializados, decorrentes das situações particulares que se indicam, deverão ser enquadrados.

RISCO QUÍMICO

Os produtos químicos empregues nos ensaios biológicos distribuem-se por diversos tipos associados a diferentes riscos para o operador. Quando apropriado, os riscos conhecidos dos reagentes a empregar serão indicados, devendo então ser adoptadas as regras específicas mais aconselhadas, como seja o uso de luvas ou óculos, trabalho em hotte, etc.

As práticas previstas no âmbito desta disciplina não farão uso generalizado de reagentes perigosos ou de grande risco conhecido para a Saúde Humana.

RISCO RADIOLÓGICO

De todos os riscos associados com os trabalhos de virologia, o mais emotivo, que não necessariamente o mais sério, é a radioatividade. Ao contrário dos outros reagentes químicos, os compostos radioativos, por este fato, não podem ser vistos e são isentos de cheiro, não se manifestando os seus efeitos no imediato. As regras para a manipulação de produtos radioativos são bastante mais rigorosas e tornam-se muito mais restritivas ao trabalho a desenvolver. Às exigências para manipulação destes produtos no trabalho, acrescem procedimentos particulares para a eliminação dos resíduos e monitorização das pessoas e ambientes envolvidos.

Os trabalhos a executar no âmbito desta disciplina não farão uso de reagentes ou outros compostos radioativos.

RISCO BIOLÓGICO

Todas as amostras de produtos biológicos devem ser consideradas potencialmente infecciosas, em particular as que são provenientes do Homem, em que uma eventual barreira de espécie na transmissão dos agentes infecciosos não existe. As outras espécies animais mamíferos potencialmente usadas nos trabalhos laboratoriais não representam qualquer ameaça significativa para as pessoas que trabalham nos laboratórios.

Em qualquer dos casos convém ter presente que as principais vias de transmissão de infeções ocorrem em golpes abertos ou outras soluções de continuidade na pele das mãos do operador, por picada com agulhas contaminadas ou por inalação de aerossóis. É por isto que é fortemente recomendado que, quando se trate de trabalho directo com amostras biológicas, não existam golpes nas mãos do operador que não tenham sido previamente protegidos e convenientemente impermeabilizados.

O trabalho a desenvolver nas práticas da disciplina não fará uso de soros ou outros materiais biológicos de origem humana, caso em que precauções especiais teriam de ser tomadas para minimizar o risco de associado aos agentes infecciosos transmissíveis pelo sangue humano, como os agentes da SIDA ou das Hepatites. Em todo o caso, é sempre aconselhável considerar todos os materiais biológicos a empregar como potencialmente infecciosos para o operador e adoptar as práticas mais adequadas ao cenário do "pio caso".

Adicionalmente há que considerar que o trabalho prático decorrerá no laboratório de Microbiologia, onde microrganismos de diferentes tipos são manipulados por outras pessoas. A possibilidade de contaminação das superfícies e outros materiais também deverá ser considerada.

REGRAS

Para além dos riscos para o operador, que atrás se referem, as experiências que se realizarão são certamente novidade para alguns dos estudantes, com experiência laboratorial limitada e rotinas de boas práticas laboratoriais não estabelecidas. Importa, por isso, prevenir.



É boa prática observar, cumprir e fazer cumprir as regras, procedimentos e comportamentos que se indicam:

Bata

O uso de uma bata comprida, limpa e devidamente ajustada ao corpo é indispensável sempre que se opere em laboratório. A bata protege o operador e o seu vestuário de eventuais acidentes. Idealmente a bata deverá ser usada apenas no laboratório, sendo vestida à entrada e despida à saída. Desta forma, além de proteger o experimentador, a bata minimiza o transporte de potenciais agentes infecciosos para o exterior do laboratório.

Mãos

À entrada e à saída do laboratório é preciso lavar bem as mãos com abundante água e sabão, também para minimizar potenciais contaminações cruzadas. Dependente do tipo de produtos a manipular, o uso de luvas impermeáveis, máscaras ou outras proteções, poderá ser exigível. Mesmo quando normalmente não recomendado, o uso de luvas poderá ser necessário em situações de solução de continuidade na pele das mãos do operador.

Comer e beber

É expressamente proibido comer, beber, fumar, manipular lentes de contato ou aplicar cosméticos durante a execução de experiências laboratoriais. Usar sempre pipetas mecânicas, nunca pipetar com a boca. É aconselhável adquirir o hábito de manter as mãos longe da boca.

Bancada de trabalho

O local de trabalho deverá estar sempre devidamente limpo, para o que se impõe proceder à limpeza da bancada antes de iniciados os trabalhos, para não permitir a contaminação das próprias experiências com microrganismos de sessões anteriores, e depois das manipulações terminadas para minimizar a potencial propagação de agentes infecciosos contaminantes dos materiais biológicos com que se operou.

Livros e cadernos

Só é permitido levar para a bancada o material de apoio estritamente indispensável à execução do trabalho, como o protocolo experimental, um bloco de notas ou um caderno e um lápis. Todos os restantes pertences do operador, como pastas, casacos ou sacos deverão ser acondicionados em local próprio, antes de iniciada a experimentação.

Materiais

Todo o equipamento e material de laboratório amovível, utilizado durante a experimentação, deverá ser reposto no local indicado depois de concluída a sua utilização. Particularmente os materiais que tenham contactado com amostras de origem biológica ou infecciosa deverão ser rejeitados em local próprio para descontaminação.

Acidentes

Qualquer acidente deverá ser de imediato reportado ao responsável pela sessão de trabalho. Líquidos ou outro material biológico, inadvertidamente transferidos para fora dos contentores a que se destinam deverão ser de imediato desinfectados com o apoio do responsável.

PLANEAMENTO

Não iniciar qualquer experiência sem o conveniente planeamento. O conhecimento e compreensão prévios dos procedimentos experimentais, grelhas adequadas para registo dos resultados e a efetiva disponibilidade de todos os recursos materiais necessários constituem elementos importantes para o sucesso das experiências. O tempo "perdido" num planeamento inicial é largamente compensado pelo nível da aprendizagem conseguido e pela prevenção da necessidade de repetição de experiências eventualmente bloqueadas.

PROCEDIMENTOS GERAIS

Todos os procedimentos deverão ser efetuados tendo em mente a minimização da contaminação do material em uso e a formação de aerossóis ou respingos, numa perspectiva de proteção do próprio operador e de terceiros. Mais importante que um conjunto de regras a obedecer é a presença de bom senso nos trabalhos a realizar. É muito importante usar a cabeça antes das mãos.



REGISTOS E RELATÓRIOS

É conveniente usar um bloco ou caderno para registo de todas as ocorrências e dos resultados da experimentação. Sugere-se o uso de caderno de laboratório, de preferência com folhas não amovíveis, para que não sejam eliminadas notas ou registos considerados irrelevantes na altura, como sucede com frequência quando se passam os apontamentos "a limpo", mas de grande utilidade para consulta futura na elaboração do relatório final ou para a eventual repetição da experiência. O rigor e pormenor dos registos efetuados durante a execução do trabalho experimental facilitarão a aprendizagem e a interpretação dos resultados obtidos, em especial quando estes são inesperados.

Um qualquer relatório de uma experiência laboratorial deverá documentar de forma tão completa quanto possível o procedimento executado e os resultados obtidos. Para além disso deverá ser também objetivo do relator redigir um documento compreensível para o leitor e susceptível de apoiar a eventual repetição da mesma experiência em idênticas condições. Para a elaboração dos relatórios sugerem-se, como orientação, as seguintes seções:

Título	Identificador do conteúdo do relatório
Resumo	Pequeno texto de que constem os objetivos almejados e as conclusões obtidas
Objetivo	Razão de ser do trabalho realizado
Introdução	Dados conhecidos que justificam a realização da experiência relatada
Palavras-chave	Termos diretamente relacionados com o trabalho
Material e reagentes	Listagem exhaustiva do equipamento, reagentes e outro material usado
Protocolo experimental	Marcha geral dos procedimentos aplicados. Deverão ser relatados os procedimentos concretos executados, com referência a eventuais desvios relativamente ao procedimento recomendado / descrito
Resultados	Registo das observações efetuadas e dos dados recolhidos
Discussão	Comentário crítico aos resultados obtidos
Conclusão	Descrição do cumprimento ou incumprimento do objetivo, decorrente dos resultados obtidos
Nota crítica	Comentário à globalidade da experiência, com recomendações para a sua repetição ou outras consideradas adequadas
Bibliografia	Referências consultadas ou utilizadas para a realização do trabalho
Dependente do tipo do trabalho executado, da forma do relatório e da sensibilidade do relator, algumas das seções descritas poderão ser fundidas, como "Resultados e discussão" ou "Discussão e conclusões", por exemplo	



TÉCNICAS LABORATORIAIS BÁSICAS EM MICROBIOLOGIA/VIROLOGIA

Os microrganismos são ubíquos. Podem encontrar-se no solo, no ar, na água, na comida, nos esgotos e nas superfícies corporais, entre outros locais. Ou seja, existem por todo o lado à nossa volta, o nosso ambiente está repleto de microrganismos. Para estudar qualquer tipo de microrganismo é necessário separar estas populações mistas, de forma a manipular no laboratório as chamadas culturas puras, culturas de uma única estirpe. No caso particular dos estudos em virologia, em que os vírus precisam de "meios de cultura vivos", é necessário dispor de culturas puras das células hospedeiras para a propagação de culturas puras de estirpes virais.

Para isolar e estudar os vírus e os microrganismos em cultura pura, o experimentador necessita de alguns equipamentos laboratoriais básicos e da aplicação de técnicas específicas usando materiais particulares. Nas práticas que aplicaremos no decurso desta disciplina, em que estudaremos vírus infecciosos para bactérias (bacteriófagos), ter-se-á de recorrer às técnicas base de microbiologia/bacteriologia com utilização dos equipamentos e materiais específicos que se indicam:

Equipamento	Autoclave e dispositivos de filtração estéril Ansas e agulhas. Pipetas e micropipetas Banhos de água e estufas Frigorífico Fluxo laminar (conveniente)
Materiais	Água destilada de qualidade Meios de cultura (bactérias) Líquido Semissólido Sólido Tubos para cultura Placas de Petri

MEIOS DE CULTURA

Uma das características exclusivas dos vírus, que os diferenciam dos restantes seres vivos, reside na sua necessidade de infectar células vivas para se propagarem. O substrato para o crescimento dos vírus é, assim, uma célula hospedeira. Os meios de cultura necessários ao trabalho em virologia respeitam às células infectadas pelos vírus em estudo.

A sobrevivência e o suporte de vida dos microrganismos dependem do fornecimento adequado de nutrientes e convenientes condições para o seu crescimento. Quanto aos nutrientes, grande parte dos microrganismos apenas necessitam de substância solúveis de baixo peso molecular, usualmente originadas pela degradação enzimática de outros nutrientes mais complexos. Uma solução contendo estes nutrientes é designada como meio de cultura. Em geral, os meios de cultura são líquidos, semissólidos ou sólidos. Um meio líquido sem agente solidificante é designado por caldo nutritivo. Um caldo nutritivo suplementado com um agente solidificante, usualmente o agar, origina um meio sólido ou semissólido. O agar é um extrato de algas marinhas, um carbo-hidrato complexo que contém maioritariamente galactose e possui muito pouco valor nutritivo. O agar é muito adequado como agente solidificante porque se liquefaz a cerca de 100°C e solidifica a 40°C. Devido a estas propriedades, os microrganismos, em especial os patogénicos, podem ser cultivados a temperaturas da ordem dos 37°C sem receios de liquefação do meio solidificado. Um meio de cultura bem solidificado exige uma concentração de agar da ordem dos 1,5 a 1,8%. Uma concentração inferior a 1% resulta num meio semissólido.

A grande vantagem e utilidade dos meios sólidos e semissólidos em estudos de virologia residem no fato de as células hospedeiras poderem ser imobilizadas, mantendo a sua viabilidade, e de as partículas virais verem reduzida a sua capacidade de difusão no meio. Tal como para o isolamento de colónias de bactérias na superfície do agar, também nos meios sólidos e semissólidos se podem isolar individualmente as estirpes virais em presença.

Para além das necessidades nutritivas, vários outros fatores ambientais precisam de ser controlados para o sucesso da cultura dos microrganismos e de suporte das infeções virais, como sejam o pH, a temperatura, o ambiente gasoso ou a pressão osmótica.

Um outro aspecto relevante das "culturas de vírus" relaciona-se com as quantidades relativas de vírus e células hospedeiras no início da infeção e da capacidade dos hospedeiros para suportar a propagação viral. Isto implica, com frequência, dispor de células em fase de crescimento exponencial para que a infeção viral possa ocorrer com sucesso.

ESTERILIZAÇÃO

A esterilização é um dos pontos-chave para o sucesso do trabalho em virologia. Para trabalhar em condições de esterilidade é fundamental o uso de material estéril e a aplicação de técnicas adequadas. A esterilização é processo pelo qual são eliminadas todas as formas de vida de qualquer meio ou material. As principais técnicas para a esterilização de rotina em laboratório são as seguintes:

Calor	Calor seco (ar quente) 160°C a 180°C durante 1/2 hora a 3 horas Material de vidro em vazio Calor húmido (vapor) Circulação de vapor a 100°C. Esterilização intermitente (soluções termo-lábeis) Autoclave. Vapor sob pressão, temperaturas acima dos 100°C (meios de cultura, soluções termo-estáveis)
Filtração	Membranas filtrantes com poros de 0,05 µm a 0,8 µm Remoção de microrganismos de soluções termo-lábeis por filtração
Produtos químicos	Óxido de etileno Material de plástico Beta-propiolactona Tecidos vivos, materiais biológicos

TUBOS DE CULTURA E PLACAS DE PETRI

Tubos de ensaio em vidro e placas de Petri em vidro e plástico constituem os principais suportes para o desenvolvimento das culturas de microrganismos que suportam a propagação dos bacteriófagos a utilizar. Um meio nutritivo adequado na forma de caldo nutritivo ou de agar é usado em tubos de ensaio, enquanto nas placas de Petri apenas se usa meio sólido. Um ambiente estéril é preservado nos tubos de cultura por vários tipos de tampas. Historicamente é o rolo de algodão hidrófobo, desenvolvido por Schroeder e von Dusch no século dezanove. Hoje em dia, a maior parte dos laboratórios usam tampas em forma de manga, em metal ou plástico resistente ao calor. A vantagem destas tampas reside no fato de não exigirem tanto trabalho na sua preparação e serem mais facilmente removidas e reintroduzidas nos tubos durante a manipulação.

As placas de Petri disponibilizam uma maior superfície para cultura e crescimento dos microrganismos. São compostas por uma base circular inferior, onde é colocado o meio e por uma tampa do mesmo formato e ligeiramente maior que se encaixa na base. Existem placas de Petri de várias dimensões para diferentes exigências laboratoriais. Na rotina são usadas placas de cerca de 10 cm de diâmetro. O meio nutritivo estéril, contendo agar, num volume de 15 a 20 mL é vertido nas placas quando ainda quente após fusão do agar e deixado arrefecer a temperatura inferior a 40°C. Depois de inoculadas com os microrganismos as placas são incubadas em posição invertida para evitar que as gotas de condensação, formadas na tampa durante o arrefecimento do agar, caiam sobre a superfície do agar.

A imobilização das bactérias e a dificuldade de difusão das partículas virais nos meios sólidos associados à pequena espessura do suporte permite identificar e isolar bacteriófagos individuais, como se verá no decurso do trabalho experimental.

INSTRUMENTOS PARA TRANSFERÊNCIA DE CULTURAS

Existe a necessidade de transferir os microrganismos de um meio de cultura para outros, desde culturas de armazenamento e manutenção para culturas de análise, para o isolamento de fagos ou para a sua expansão em massa. É o processo de subcultura que tem de necessariamente ser efetuado com técnica estéril para evitar potenciais contaminações das subculturas.

As ansas e agulhas, usualmente fabricadas com metais inertes como a platina e inseridas em cabos próprios para a manipulação, são instrumentos muito duráveis de fácil utilização. São facilmente esterilizáveis no momento da sua utilização por incineração à chama, numa posição quase vertical até o metal ficar ao rubro. Importará depois deixar arrefecer entre 10 a 20 segundos, fora da chama, mas na sua proximidade, onde a carga de microrganismos ambientais viáveis é inferior. Depois de arrefecidos, para não inativar os microrganismos a transferir, podem ser usadas para "picar" uma cultura sólida ou líquida e inocular outro meio. Uma vez esterilizada, a ansa deverá ser de imediato utilizada antes de ser de novo colocada na bancada.

As pipetas são outros dos instrumentos de transferência de culturas de uso muito generalizado. São calibradas e permitem a transferência de quantidades de culturas líquidas preestabelecidas. São de vidro ou plástico, com uma extremidade afilada e outra para a aspiração e expulsão do líquido que contenham. Podem ser esterilizadas por calor



seco ou húmido, conforme o tipo de material de que são constituídas. Apesar de tradicionalmente serem instrumentos para "pipetar à boca" é proibido usar a boca para aspirar microrganismos. Existem auxiliares mecânicos disponíveis para o efeito, como peras de borracha ou corpos de seringa que se adaptam na extremidade larga da pipeta.

As pipetas Pasteur, tubos de vidro não graduados com uma das extremidades afiladas são também de uso muito frequente em estudos de virologia, também pela sua facilidade de esterilização extemporânea.

CÂMARAS DE CULTURA

Das condições para crescimento dos microrganismos, uma das mais relevantes é a sua temperatura óptima de crescimento. As estufas são usadas para a manutenção da temperatura óptima dos microrganismos em crescimento durante o período de cultura. São câmaras em que a temperatura ambiente interior é controlada por termóstato, para que a mesma seja mantida dentro de limites apropriados para o crescimento celular. Usam em geral um sistema de circulação de ar aquecido e, para evitar a desidratação dos meios em incubação, deverão conter também uma fonte de vapor de água (um recipiente com água no seu interior, quando não venham preparadas para o efeito de origem).

Os banhos de água (banho-maria) com água a temperatura controlada por termóstato constituem outro dos instrumentos frequentemente empregues para a criação das condições de temperatura óptima de crescimento dos microrganismos. O íntimo contato da água a temperatura controlada com o recipiente onde crescem os microrganismos apresenta a vantagem de permitir uma mais rápida e eficaz transferência do calor. Além disso, os banhos com agitação facilitam também o arejamento das culturas, de grande importância para o crescimento dos microrganismos aeróbios. A desvantagem do banho de água reside no fato de só poder ser usado para as culturas em meio líquido, ao contrário das estufas de ar, que servem tanto para culturas em meio líquido como em meio sólido.

Os vírus porque só podem crescer em células que estejam em crescimento requerem, naturalmente, o mesmo tipo de câmaras de cultura usadas para os respectivos hospedeiros.

FRIGORÍFICO

O frigorífico é outra das peças fundamentais em laboratório de virologia. O ambiente de baixa temperatura que disponibiliza é da maior relevância para a manutenção e armazenamento das culturas celulares em fase de não crescimento entre os períodos de subcultura, para a manutenção das suspensões virais e para a conservação dos meios esterilizados e outros reagentes. Também as soluções e compostos termo-lábeis têm períodos de conservação mais alargados quando armazenados a baixas temperaturas.



MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO

Esterilização é um processo que elimina todos os organismos vivos que se encontrem à superfície ou no interior de um material, podendo ser alcançado pela exposição do material a agentes letais físicos ou químicos ou, no caso dos líquidos, pela separação mecânica dos organismos através de filtrações. Existem muitas formas de esterilizar materiais e meios, e a sua escolha depende da natureza dos materiais a serem esterilizados bem como da disponibilidade de meios de trabalho.

A noção de esterilidade (estéril = infecundo) encontra-se frequentemente associada a duas outras: a de assepsia (ausência de sepsis = putrefação) e a de desinfecção (livrar da infecção). Estes significados literais correspondem, de fato, às noções técnicas destas terminologias. Em microbiologia referimo-nos a esterilização quando se pretende impedir a propagação de microrganismos; a assepsia quando se pretende trabalhar em ambiente desprovido de microrganismos e a desinfecção quando se aplicam técnicas destinadas a eliminar microrganismos potencialmente patogénicos para o operador. A forma de eliminação da infecciosidade viral depende das características do vírus em causa.

Destas noções, a adquirir no exercício da experimentação que se desenvolverá na disciplina, importa considerar em particular as técnicas que se utilizam em microbiologia para a eliminação de microrganismos viáveis: a esterilização.

ESTERILIZAÇÃO PELO CALOR

A. Calor Húmido

O aparelho mais usado para esterilizar materiais e meios de cultura é a autoclave. As autoclaves trabalham à semelhança de panelas de pressão domésticas. As autoclaves de laboratório operam normalmente sob uma pressão de 1,02 Bar a uma temperatura de 121°C. A autoclave esteriliza a maioria dos materiais em 15-30 minutos, sendo a variação do tempo de esterilização devida à relação superfície/volume dos materiais a serem esterilizados.

Aspectos da esterilização por vapor-pressão

Temperatura

Os endosporos das bactérias são as formas de vida mais resistentes ao calor, e a sua destruição pode ser conseguida se for aplicado vapor sobre pressão. Uma temperatura de 121°C oferece uma boa margem de segurança se for mantida durante um espaço de tempo apropriado.

Humidade

A coagulação do protoplasma bacteriano em temperaturas moderadas requer humidade e há medida que esta é removida a temperatura necessária para haver coagulação aumenta rapidamente. Se o vapor for sobreaquecido ficará mais "seco" o que ocasiona um aumento da temperatura e do tempo de exposição para a esterilização, que na situação extrema de esterilização em calor seco será de 170°C durante uma hora. Em conclusão, vapor excessivamente quente perde alguma da sua eficácia como agente letal para além de poder ser lesivo para os materiais a serem tratados.

Pressão

A pressão, nos valores usados na autoclave, por si só não exerce qualquer efeito na esterilização, sendo útil para elevar a temperatura do vapor acima dos 100°C.

Tempo

O tempo é necessário para que o vapor tenha a oportunidade de penetrar e aquecer os materiais a serem esterilizados. Mesmo quando as temperaturas de esterilização são atingidas, os agentes virais ou microbianos não são todos mortos de uma vez. A velocidade de morte é uma constante a uma dada temperatura e por cada unidade de tempo de exposição ao agente letal, uma proporção que é constante para uma dada população. Normalmente demora 11 a 12 minutos a 121°C (calor húmido) para matar os endosporos das bactérias termofílicas, os agentes mais resistentes nas manipulações do dia-a-dia.

Purga

O ar relativamente frio na câmara de esterilização é muito mais pesado que o vapor à temperatura de esterilização. Se não for permitida a saída do ar cria-se uma estratificação na autoclave que conduz a uma falta de uniformização das temperaturas desenvolvidas. Uma vez que o ar e o vapor são lentos a misturarem-se, as diferenças de temperatura entre camadas pode ser muito grande, por isso a necessidade de se substituir todo o ar por vapor (purga).



Natureza do carregamento

Geralmente, os materiais mais volumosos requerem um maior tempo de esterilização, sendo preferível esterilizar pequenos volumes de cada vez, por exemplo é preferível esterilizar 5 balões de litro de cada vez do que esterilizar apenas um balão com cinco litros. Os frascos devem ser tapados com algodão ou papel. Se for necessário usar tampas roscadas, devem ir pouco apertadas para a autoclave de modo a permitirem a saída de ar e entrada de vapor, evitando-se assim o rebentamento de frascos na autoclave.

B. Calor seco

O calor seco é usado para esterilizar material de vidro, outros materiais sólidos termoestáveis e alguns componentes de meios ou alimentos que ficariam impróprios se expostos ao vapor. Trata-se também de um dos métodos de esterilização mais usados e de muito fácil aplicação. O equipamento indispensável é apenas uma estufa de alta temperatura (160 – 200°C). Para além de ter de ser tida em conta a resistência térmica dos materiais a esterilizar por esta técnica, a outra precaução a considerar prende-se com a minimização da possibilidade de contaminar esses materiais depois da esterilização.

ESTERILIZAÇÃO POR GASES

O recente incremento do uso de material de plástico de utilização única ("disposable") como seringas, caixas de Petri, tubos de cultura, filtros, etc., levou ao desenvolvimento de uma nova forma de esterilização que usa gases tóxicos para a eliminação dos microrganismos de materiais termo-sensíveis. A aplicação desta técnica requer a utilização de equipamentos próprios que forcem a circulação do gás tóxico através de todas as superfícies dos materiais, o que a torna de difícil utilização em laboratórios de tipo não industrial.

O óxido de etileno é o gás usado com maior frequência neste tipo de esterilizações. Este gás, ao contrário de muitos produtos químicos tóxicos, é pouco corrosivo e não altera os materiais a serem esterilizados, sendo facilmente removido por arejamento. As suas desvantagens incluem a necessidade de longos períodos de exposição para se obter a esterilização (várias horas), a reatividade com componentes dos meios e certos tipos de plásticos e a necessidade de equipamentos próprios e disponibilidade do gás, como se referiu.

RADIAÇÕES

Alguns processos comerciais usam as radiações para a esterilização a frio de certos materiais como produtos farmacêuticos, por exemplo. A irradiação é o uso de radiações ionizantes de alta energia que incluem raios gama produzidos a partir de cobalto-60 ou cério-139 e de raios catódicos produzidos em geradores e aceleradores de electrões.

A irradiação com luz ultravioleta não é uma forma muito satisfatória de esterilização dada a sua fraca capacidade de penetração nos materiais e produtos a esterilizar. É, contudo, de utilização frequente na diminuição do nível de contaminação de espaços confinados, como salas estéreis ou pequenos ambientes, sendo particularmente úteis também para a redução da infecciosidade viral devido às alterações induzidas no material genético das partículas virais expostas.

FILTRAÇÃO ESTÉRIL

O principal método para a esterilização de líquidos que contenham componentes termo-sensíveis tais como vitaminas, proteínas séricas e antibióticos, por exemplo, é a filtração. Tradicionalmente os microbiologistas esterilizavam estes produtos recorrendo a filtros feitos a partir de terra de diatomáceas e fibras de asbesto, previamente esterilizados em autoclave. Presentemente estes filtros foram substituídos por filtros de acetato de celulose ou policarbonatos nos quais os tipos de poros desenvolvidos permitem filtrações com elevados graus de precisão. Existem atualmente disponíveis no mercado filtros esterilizantes de vários poros e capacidades filtrantes. Os mais frequentes e, por isso, mais acessíveis são filtros de poros de 0,45 µm ou 0,2 µm de diâmetro, que retêm os microrganismos presentes nas soluções.

Para esterilizar uma solução por filtração, não há mais que passar essa solução através de um destes filtros pela aplicação de uma pressão positiva no líquido a filtrar (filtros de seringa, por exemplo) ou na rarefação do ar no contentor que recebe o filtrado. Em qualquer dos casos esta técnica requer a recolha do filtrado em condições de assepsia para impedir a contaminação do líquido esterilizado.



Salvo raras exceções, a filtração estéril não retém as partículas virais. Não podendo ser considerado como método de "esterilização de vírus". A filtração estéril é mesmo uma técnica frequentemente usada em virologia para a purificação de suspensões virais pela eliminação de bactérias potencialmente contaminantes.

DESINFECTANTES E ANTISSEPTICOS

Múltiplos reagentes químicos são diariamente utilizados para controlo da disseminação de microrganismos. Os produtos usados na "limpeza" de utensílios diversos, frequentemente demasiado tóxicos para ser usados diretamente no Homem, são chamados de desinfetantes. Os produtos que aplicamos na pele, com o mesmo objetivo de eliminar eventuais microrganismos, são antissépticos.

Particularmente eficaz e muito útil no laboratório, para eliminação de vírus e microrganismos é a solução de hipoclorito de sódio (lixívia) com que se tratam os materiais de laboratório após exposição a agentes infecciosos.



BACTERÍOFAGOS

Os vírus diferem das bactérias por serem muito mais pequenos, de constituição não celular e parasitas intracelulares. Adicionalmente não são capazes de crescer em meios de cultura não vivos. Apesar disso é possível estudá-los no laboratório, detectando a sua presença pelos efeitos que provocam nas células que infectam.

Existem vírus com especificidade para diversos tipos de células, tanto eucarióticas como procarióticas. A estrita dependência de células hospedeiras deve-se à sua incapacidade para sintetizar as enzimas necessárias aos mecanismos da sua propagação. Ao penetrarem nas células são capazes de usar as enzimas do hospedeiro em seu próprio proveito.

O estudos de vírus que parasitam células vegetais ou animais exige recursos específicos para cultura de tecidos, sendo estas técnicas em geral demasiado demoradas para execução em aulas práticas do nível que aqui se pretendem desenvolver. Para além disso e apesar da especificidade para certos hospedeiros a utilização de vírus de eucariotas exige cuidados de contenção biológica bastante apertados.

Os vírus que parasitam as bactérias, os bacteriófagos ou simplesmente fagos são de mais fácil manipulação, exigem a aplicação de técnicas gerais de microbiologia, menos demoradas por via das rápidas taxas de crescimento das bactérias usadas. Os cuidados para o confinamento biológico das experiências também não precisa de ser tão apertado como para o uso de vírus eucarióticos.

Quando um fago infecta uma bactéria receptiva uma de duas coisas acontecerá: a lise ou a lisogenia da bactéria. Quando ocorre a lise o metabolismo da bactéria é reorientado para a síntese do DNA genómico do vírus e das proteínas para produzir as partículas fágicas maduras. Usado o material celular disponível, a célula rebenta e liberta os viriões maduros, capazes de reinfectar novas bactérias que encontrem.

Os bacteriófagos que provocam a lise da bactéria são chamados de virulentos ou líticos. Quando a infeção não conduz à morte da bactéria, estabelece-se entre esta e o vírus um relacionamento designado por lisogenia e o fago é denominado de temperado ou lisogénico. Nestes casos o DNA do fago é integrado no cromossoma da bactéria e esta cresce normalmente. Ocasionalmente uma destas bactérias entra em ciclo lítico e liberta viriões capazes de infetar outras células.

A evidência visual da lise de uma bactéria é conseguida pela cultura da bactéria em meio sólido, em camada uniforme e infeção de algumas células com o bacteriófago. A camada de bactérias, naturalmente opaca, apresenta círculos claros correspondentes aos locais em que um fago infetou e destruiu a população de células vizinhas. São as placas virais. Nos casos de fagos lisogénicos, como só algumas das bactérias entram em ciclo lítico, estas placas são translúcidas.



PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

PIPETAGENS, SOLUÇÕES E DILUIÇÕES

Introdução

O rigor nas diluições a efetuar com alguns materiais biológicos e reagentes, no contexto de vários dos trabalhos experimentais que aqui se incluem, é crítico e fundamental para o sucesso e para a fiabilidade dos resultados.

Porque se observa com frequência alguma inabilidade inicial dos estudantes para a manipulação adequada das micropipetas, para um raciocínio operacional sobre diluições (em especial quando expressas em potências de 10) e nas formas de preparar soluções tituladas, introduz-se este trabalho preliminar.

Material e reagentes

- Solução saturada de azul-de-metileno
- Água destilada
- Micropipetas diversas
- Microtubos
- Espectrofotómetro

Procedimento (por grupo)

Diluições decimais

1. Marque microtubos de 1 a 8
2. A partir da solução concentrada de azul-de-metileno proceda, às seguintes diluições sequenciais:

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8
Solvente (mL)	0	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35	1,5
Corante (mL)	1,5	0,15	0	0	0	0	0	0
Solução precedente (mL)	0	0	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0
Diluição (10 ^x)								

3. Completar o preenchimento da tabela acima com as diluições em cada tubo.
4. Verifique os volumes relativos e registe as intensidades de cor observáveis nos diferentes tubos
5. Determine a absorvência das soluções a 600-660 nm (ler da mais diluída para a mais concentrada, na mesma cuvete. Última amostra: controlo).

Diluições centesimal

1. Marque tubos de ensaio de 1 a 6
2. A partir da solução concentrada de azul-de-metileno proceda, às seguintes diluições sequenciais:

Tubo	1	2	3	4	5	6
Solvente (µL)	0	1500	1500	1500	1500	1500
Corante (µL)	1500	15	0	0	0	0
Solução precedente (µL)	0	0	15	15	15	0
Diluição (10 ^x)						

3. Completar o preenchimento da tabela acima com as diluições em cada tubo.
4. Verifique os volumes relativos e registe as intensidades de cor observáveis nos diferentes tubos
5. Determine a absorvência das soluções dos tubos com número par a 600-660 nm (ler da mais diluída para a mais concentrada, na mesma cuvete. Última amostra: controlo)



Diluições de três em três

6. Marque tubos de ensaio de 1 a 10)
7. A partir da solução concentrada de azul-de-metileno proceda, às seguintes diluições sequenciais:

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Solvente (mL)	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1,5
Corante (mL)	1,5	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0
Solução precedente (mL)	0	0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0
Diluição (10 ^x)										

8. Completar o preenchimento da tabela acima com as diluições em cada tubo.
9. Registe as intensidades de cor observáveis nos diferentes tubos
10. Determine a absorvência das soluções dos tubos com número par a 600-660 nm (ler da mais diluída para a mais concentrada, na mesma cuvete)

Diluição única (TPC)

- Considerando os trabalhos anteriores, desenhe um protocolo para a realização de teste a diluições milésimas.
- A partir da solução concentrada de azul-de-metileno faça os cálculos para proceder à preparação de 5 mL de cada uma das seguintes soluções, indicando os volumes a usar:
 - a. Diluição de 5×10^2
 - b. Diluição de 5×10^{-2}

Preparação de soluções (TPC)

- Pretendendo-se obter 100 mL de cada uma das soluções que se listam, indique as quantidades de produtos a misturar para a sua preparação no laboratório:
 - a. NaOH 0,1 N
 - b. SO₄H₂ 0,1 N
 - c. NaCl 0,1 M
 - d. NaCl 100 mM
 - e. Glicerol 10% (fórmula C₃H₈O₃)
 - f. Glucose 10% (fórmula C₆H₁₂O₆)
 - g. Etanol 70% (fórmula C₂H₆O₂)

Pesos atômicos: H=1; C=12; O=16; Na=23; S=32; Cl=35.



Registo de observações e Resultados

PIPETAGENS E DILUIÇÕES

Operador: _____ Data: ____/____/____

Diluições decimais	Tubo	Amostra	DO _{600nm} / mL	Concentração calculada	Observações
	1				
	2				
	3				
	4				
	5				
	6				

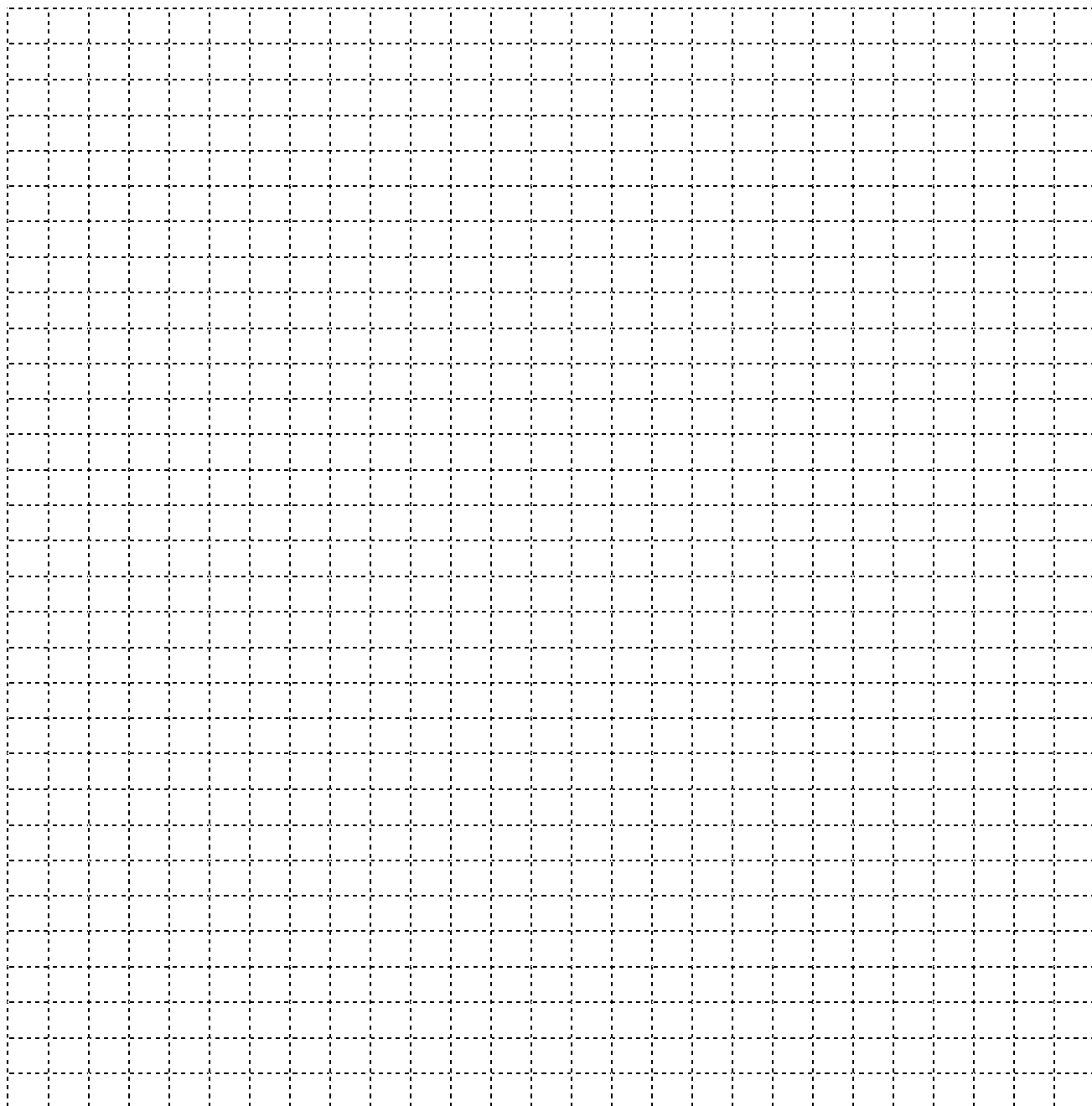
Diluições centesimais	Tubo	Amostra	DO _{600nm} / mL	Concentração calculada	Observações
	1				
	2				
	3				
	4				
	5				
	6				

Diluições de três em três	Tubo	Amostra	DO _{600nm} / mL	Concentração calculada	Observações
	1				
	2				
	3				
	4				
	5				
	6				

Diluições únicas	Amostra	DO _{600nm} / mL	Concentração calculada	Observações
	5 x 10 ²			
	5 x 10 ⁻²			



Gráficos



Notas:

SOLUÇÕES



Operador: _____ Data: ____/____/____

NaOH 0,1 N (100 mL)	<i>Componentes</i>	<i>Peso / volume</i>

SO ₄ H ₂ 0,1 N (100 mL)	<i>Componentes</i>	<i>Peso / volume</i>

NaCl 0,1 M (100 mL)	<i>Componentes</i>	<i>Peso / volume</i>

NaCl 100 mM (100 mL)	<i>Componentes</i>	<i>Peso / volume</i>

Glicerol 10% (100 mL)	<i>Componentes</i>	<i>Peso / volume</i>

Glucose 10% (100 mL)	<i>Componentes</i>	<i>Peso / volume</i>

Etanol 70% (100 mL)	<i>Componentes</i>	<i>Peso / volume</i>

Notas:



CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO

Introdução

Como se sabe, as bactérias multiplicam-se por processos de fissão binária. Uma bactéria em crescimento metaboliza os nutrientes disponíveis no meio, aumenta o seu tamanho e divide-se em duas. O tempo para uma bactéria se replicar e formar dois indivíduos é o tempo de geração, característico da estirpe nas condições de cultura aplicadas.

Um vírus para se propagar precisa de infectar um hospedeiro metabolicamente ativo para poder utilizar os seus mecanismos de replicação do genoma e de síntese das proteínas virais constitutivas dos viriões.

Particularmente nos bacteriófagos líticos, o seu estudo impõe a utilização de bactérias hospedeiras em fase de crescimento. Importa, por isso, conhecer o perfil das curvas de crescimento destas bactérias para determinar o momento em que a infeção com o vírus deverá ser desencadeada.

Neste trabalho determinar-se-á experimentalmente a curva de crescimento de uma bactéria *E. coli* a utilizar no desenvolvimento dos trabalhos subsequentes.

Material e reagentes específicos

- Cultura recente de *E. coli* (ATCC 25250) em meio nutritivo (cultura de dia anterior)
- Soro fisiológico estéril
- Placas de Petri com agar nutritivo
- Tubos de ensaio, contendo 5 mL de agar nutritivo semissólido (0,75%) fundido e em banho a 50°C
- Tubos de ensaio esterilizados (10 mL mínimo)
- Tubos de centrífuga esterilizados (cerca de 10 mL)
- Pipetas Pasteur esterilizadas
- Microtubos eppendorf esterilizados
- Micropipetas (200 e 1000) e respectivas pontas esterilizadas
- Espectrofotómetro do visível (600 nm)

Procedimento (por grupo)

1. Avaliar a DO_{600nm} da suspensão bacteriana fornecida
2. Inocular 100 mL de meio nutritivo, previamente aquecido, com a suspensão bacteriana à concentração final de $DO_{600nm} = 0.05$
3. Incubar a 37°C em banho ou câmara com agitação (cerca de 120 rpm)
4. Homogeneizar a suspensão
5. Tomar amostra de 4 mL. Avaliar a DO_{600nm} (diluir com meio se necessário)
6. Tomar 2 X 0.1 mL de suspensão
7. Espalhar uma das amostras na superfície de uma placa de agar nutritivo
8. Diluir a outra amostra 1:10 e espalhar 0.1 mL na superfície de outra placa de agar nutritivo
9. Incubar as placas em estufa a 37°C durante uma noite
10. Repetir passos 5 a 10, de hora a hora até às oito horas de incubação
11. Observar as placas de agar nutritivo e contar as colónias desenvolvidas
12. Fazer gráfico que relacione as leituras da DO com o tempo de incubação
13. Calcular a concentração de bactérias, determinada pelo número de colónias reveladas, por mL de cada suspensão
14. Fazer gráfico que relacione a concentração de bactérias com o tempo de incubação
15. Relacionar as DO_{600nm} determinadas com a concentração bacteriana das suspensões analisadas



Registo de observações e Resultados

CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO

Operador: _____ Data: ____/____/____

Tempo (horas)	DO _{600nm} / mL	Bactérias / mL	Observações
0			
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			

Notas:



CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO - 2

Introdução

Dado que as duas horas da sessão laboratorial formal não são suficientes para a realização integral da curva de crescimento bacteriano, propõe-se a realização deste trabalho para ilustrar a forma de estabelecer uma curva de crescimento e tomar os dados necessários à prossecução de trabalhos futuros.

Material e reagentes específicos

(idêntico a anterior)

Procedimento (por grupo)

1. Avaliar a DO_{600nm} da suspensão bacteriana fornecida (cultura recente “overnight”)
2. Inocular 20 mL de meio nutritivo, previamente aquecido, com a suspensão bacteriana à concentração final de $DO_{600nm} = 0.05$
3. Homogeneizar a suspensão
4. Tomar amostra de 2 mL. Separar
 - a. Avaliar a DO_{600nm} (diluir com meio se necessário). Registrar valor
5. Tomar 2 X 0.2 mL de suspensão
 - a. Espalhar uma das amostras na superfície de uma placa de agar nutritivo
 - b. Diluir a outra amostra 1:10 (adicionar 1,8 mL SF) e espalhar 0.2 mL na superfície de outra placa de agar nutritivo
6. Incubar a 37°C em estufa com agitação (cerca de 120 rpm)
7. Repetir passos 3 a 5 de meia em meia hora.
8. Continuar a incubação de todas as placas inoculadas em estufa com agitação a 37°C durante uma noite
9. Observar as placas de agar nutritivo e contar as colónias desenvolvidas
10. Fazer gráfico que relacione as leituras da DO com o tempo de incubação
11. Calcular a concentração de bactérias, determinada pelo número de colónias reveladas, por mL de cada suspensão
12. Fazer gráfico que relacione a concentração de bactérias com o tempo de incubação
13. Relacionar as DO_{600nm} registadas com a concentração bacteriana das suspensões analisadas
14. Calcular a absorção específica da cultura bacteriana.



Registo de observações e Resultados

CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO - 2

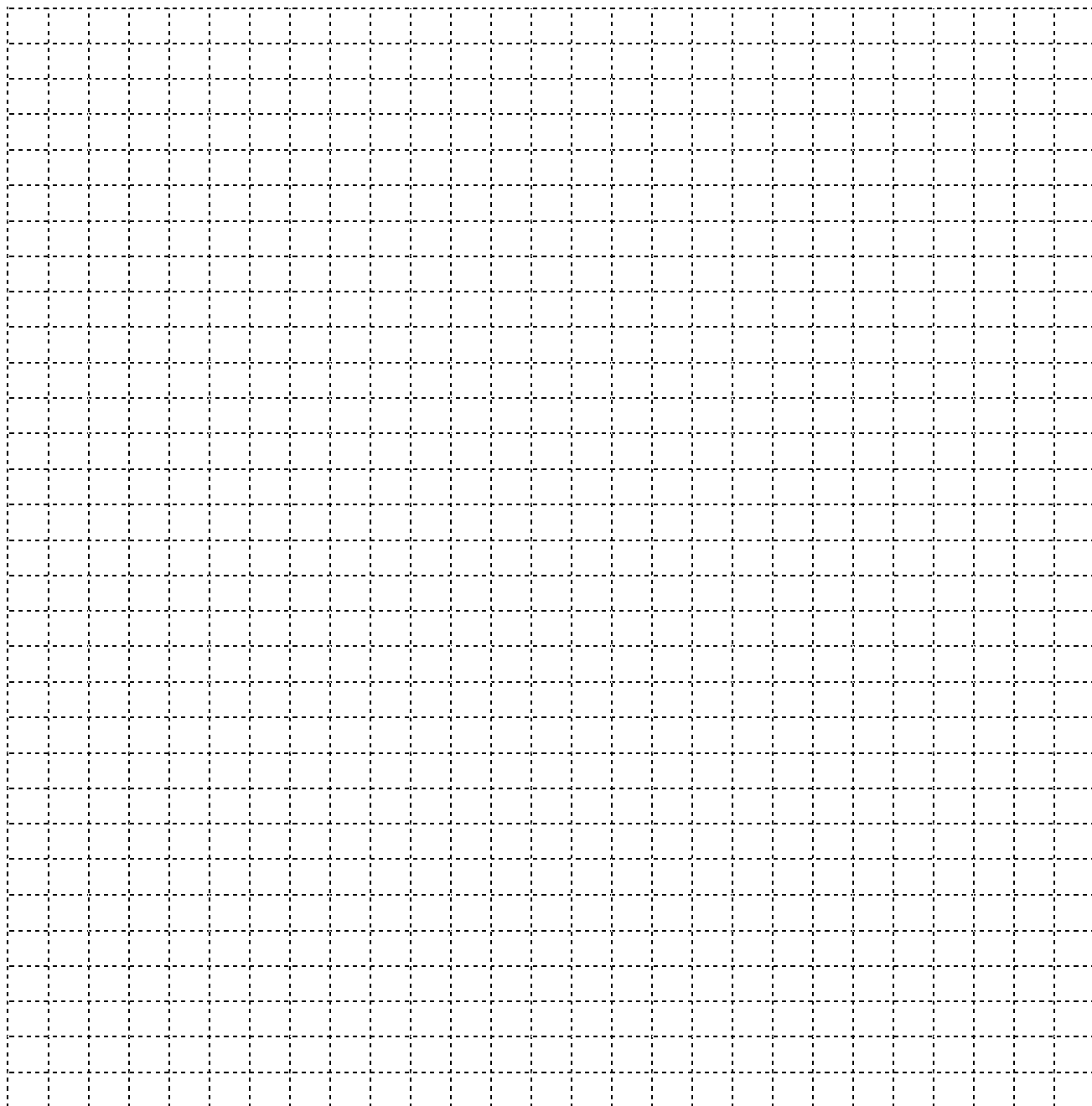
Operador: _____ Data: ____/____/____

Tempo (minutos)	DO _{600nm} / mL	Bactérias / mL	Observações
0			
30			
60			
90			

Notas:



Gráficos



Notas:



PREPARAÇÃO DE SUSPENSÃO VIRAL DE ALTO TÍTULO

Introdução

Todos os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios e são incapazes de se propagar em meios nutritivos como acontece com grande número de bactérias e outras células. Cada tipo de vírus requer um hospedeiro adequado para se replicar. Há vírus que conseguem infectar diferentes tipos de hospedeiros e outros de maior especificidade para um tipo particular de células.

Porque os vírus não possuem as atividades enzimáticas necessárias às diferentes fases dos seus ciclos de replicação, estão dependentes da atividade metabólica do hospedeiro para se propagarem. A célula infectada deve encontrar-se em crescimento ativo com a inerente produção de energia e macromoléculas utilizáveis pelo vírus aquando da infeção, para que esta possa ser produtiva.

No caso dos bacteriófagos (= "comedores de bactérias"), os hospedeiros nos quais se podem multiplicar são bactérias. É necessário que a bactéria se encontre em crescimento exponencial para a efetividade da infeção. Se o crescimento bacteriano não é ótimo na altura da infeção, a replicação viral poderá não ocorrer ou ser muito reduzida.

Material e reagentes específicos

- | | |
|---|--|
| — Suspensão de bacteriófago lítico de <i>E. coli</i> | — Tubos de ensaio esterilizados (10 mL mínimo) |
| — Cultura recente de <i>E. coli</i> em meio nutritivo (fase exponencial) | — Tubos de centrífuga esterilizados (12 mL) |
| — Soro fisiológico estéril | — Pipetas Pasteur esterilizadas |
| — Placas de Petri com agar nutritivo | — Microtubos eppendorf esterilizados |
| — Tubos de ensaio contendo 5 mL de agar nutritivo semissólido (0,75%) fundido e em banho a 50°C | — Micropipetas (200 e 1000) e respectivas pontas esterilizadas |

Procedimento

NB

Cada grupo executa o ensaio com duas diluições de vírus

- Identificar o material a utilizar no trabalho:
 - 2 X 7 Tubos eppendorf (de 1 a 7)
 - 7 Placas de Petri com agar nutritivo (de 1 a 7) e identificar: nome do grupo, data e experiência
- Nos microtubos preparar diluições decimais seriadas da amostra do bacteriófago a amplificar, uma amostra não diluída e um controlo negativo, conforme ao esquema:

Tubo #	1	2	3	4	5	6	7
Amostra inicial	200 µL	100 µL	-	-	-	-	-
Diluição anterior	-	-	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	
Soro fisiológico	-	900 µL	900 µL	900 µL	900 µL	900 µL	900 µL
Diluição final	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	0



3. Em microtubo esterilizado misturar:
 - a. 0,3 mL de cultura bacteriana em crescimento exponencial
 - b. 0,1 mL de cada diluição de bacteriófago
4. Misturar no vortex e incubar em banho-maria a 37°C durante 5 minutos
5. Adicionar o conteúdo a 5 mL de agar semissólido no estado líquido a 50°C
6. Misturar e verter de imediato na superfície de uma placa de agar nutritivo
7. Homogeneizar e deixar solidificar à temperatura ambiente (15 a 20 minutos)
8. Incubar em estufa a 37°C durante 24 horas (conservar no frigorífico até à sessão seguinte)
9. Repetir passos 3 a 8 para cada diluição.
10. Observar as placas e registar as observações
11. Escolher a primeira cultura que contenha as placas do vírus confluentes
12. Com auxílio de uma pipeta Pasteur dobrada remover a camada de agar semissólido para tubo de centrifuga
13. Adicionar 5 mL de soro fisiológico e homogeneizar por aspiração com pipeta
14. Repartir a suspensão por microtubos
15. Centrifugar 5 minutos.
 - a. Repetir centrifugação se o sobrenadante não estiver límpido
16. Tomar o sobrenadante e conservar em frigorífico a 4°C
 - a. Se necessário proceder a filtração estéril - 0,22 µm ou 0.45 µm

NB

Esta amostra será a fonte de vírus para os trabalhos subsequentes.
Cada grupo responsabiliza-se pelo seu material.



Registo de observações e Resultados

PREPARAÇÃO DE SUSPENSÃO VIRAL DE ALTO TÍTULO

Operador: _____ Data: ____/____/____

Placa	Amostra	Observação
#1		
#2		
#3		
#4		
#5		
#6		
#7		

Notas:



ISOLAMENTO DE PLACA VIRAL

Introdução

Nos trabalhos de virologia, em particular quando se manipulam agentes resultantes de recolhas do ambiente, não é garantido que esteja presente apenas uma espécie viral. É frequente neste tipo de trabalhos observar-se a formação de placas virais de características diferentes (dimensão, transparência, p. ex.) correspondendo a estirpes virais de tipo diferente.

Neste trabalho preparar-se-á uma suspensão uniforme de vírus, isolando um tipo dos restantes.

Material e reagentes específicos

— Placa de Petri com placas virais isoladas	— Pipetas Pasteur esterilizadas
— Cultura recente de <i>E. coli</i> em meio nutritivo (fase exponencial)	— Microtubos eppendorf esterilizados
— Soro fisiológico estéril	— Micropipetas (200 e 1000) e respectivas pontas esterilizadas
— Caixas de Petri com agar nutritivo	

Procedimento

1. De uma caixa de Petri com placas virais selecionar uma bem isolada e marcar posição na caixa.
2. Com pipeta Pasteur aspirar um “plug” de agar contendo a placa viral selecionada
3. Transferir o “plug” de agar para dentro de 500 μ L de SF em microtubo
4. Homogeneizar com micropipeta aspirando e expirando o “plug”
5. Identificar e marcar 5 X 2 microtubos e cinco placas de agar contendo meio nutritivo
6. Nos microtubos preparar diluições decimais seriadas da amostra do bacteriófago, conforme ao esquema:

Tubo #	1	2	3	4	5
Amostra inicial	200 μ L	100 μ L	-	-	-
Diluição anterior	-	-	100 μ L	100 μ L	
Soro fisiológico	-	900 μ L	900 μ L	900 μ L	900 μ L
Diluição final	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	0

7. No outro conjunto de microtubos esterilizados misturar:
 - a. 0,3 mL de cultura bacteriana em crescimento exponencial
 - b. 0,1 mL de cada diluição de bacteriófago
8. Misturar no vortex e incubar em banho-maria a 37°C durante 5 minutos
9. Transferir a totalidade do conteúdo de cada tubo para a superfície do agar da respetiva caixa
10. Com espalhador (pipeta Pasteur duas vezes dobrada) espalhar uniforme e completamente até à absorção completa.
11. Repetir para todas as diluições
12. Incubar em estufa a 37°C durante 24 horas (conservar no frigorífico até à sessão seguinte)
13. Observar as placas de Petri e registar as observações
 - a. O controlo valida o ensaio (ausência de placas virais)
 - b. Observar caixa de Petri com placas virais isoladas e registar presença ou não de placas de tipos diferentes



Registo de observações e Resultados

ISOLAMENTO DE PLACA VIRAL

Operador: _____ Data: ____/____/____

Placa	Amostra	Observação (existência de placas virais de tipos diferentes)
#1		
#2		
#3		
#4		
#5		

Notas:



TITULAÇÃO DE SUSPENSÃO DE BACTERÍOFAGOS – FORMAÇÃO DE PLACAS

Introdução

Diversas técnicas em virologia requerem o conhecimento preliminar da concentração viral das suspensões a usar. Importa conhecer o número de unidades infecciosas por unidade de volume da suspensão.

Em cada ciclo de uma infecção com bacteriófago lítico, cada bactéria infectada produz várias partículas virais que se libertam para o meio exterior na sequência da morte do hospedeiro. Cada uma destas partículas virais terá capacidade para infectar uma nova bactéria a que se ligue.

Quando a infecção ocorre em meio semissólido, as partículas virais que se libertam apenas podem infectar as bactérias vizinhas devido à sua difusão retardada pelo meio gelificado. Por cada bactéria inicialmente infectada observar-se-á, após cultura adequada, um espaço na cultura confluenta de bactérias, correspondente aos locais em que as bactérias foram destruídas pelos vírus (placa de lise).

A concentração de vírus na suspensão original, determinada pelo número de unidades formadoras de placas (pfu, *plaque-forming units*), pode ser calculada usando a seguinte fórmula:

$$\text{Concentração viral} = \frac{\text{Número total de placas virais}}{\text{Volume usado} \times \text{Fator de diluição}}$$

Material e reagentes específicos

- Suspensão de bacteriófago lítico de E. coli (T4) preparado no trabalho anterior
- Cultura recente de E. coli em meio nutritivo (dia anterior)
- Soro fisiológico estéril
- Placas de Petri com agar nutritivo
- Tubos de ensaio contendo 5 mL de agar nutritivo semissólido (0,75%) fundido e em banho a 50°C
- Tubos de ensaio esterilizados (10 mL mínimo)
- Microtubos eppendorf esterilizados
- Micropipetas (200 e 1000) e respectivas pontas esterilizadas



Procedimento

1. Em microtubos estéreis, identificados de 1 a 9, preparar as seguintes diluições decimais do fago:

Tubo #	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Amostra inicial	100 µL	-	-	-	-	-	-	-	-
Diluição anterior	-	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	-
Soro fisiológico	900 µL	900 µL	900 µL	900 µL	900 µL	900 µL	900 µL	900 µL	900 µL
Diluição final	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	Controlo

2. Em microtubo esterilizado misturar:
 - a. 0,3 mL de cultura bacteriana em crescimento exponencial
 - b. 0,1 mL de cada diluição de bacteriófago
 - c. Misturar no vortex e incubar em banho-maria a 37°C durante 5 minutos
3. Adicionar a totalidade do conteúdo a 5 mL de agar semissólido no estado líquido a 50°C
 - a. Misturar e verter de imediato na superfície de uma placa de agar nutritivo
 - b. Homogeneizar e deixar solidificar à temperatura ambiente (15 a 20 minutos)
 - c. Incubar em estufa a 37°C durante 24 horas (conservar no frigorífico até à sessão seguinte)
4. Observar as placas de Petri e contar o número de placas virais em três placas de Petri consecutivas com placas virais contáveis
 - a. Registrar as observações e os resultados.
5. Calcular o título da suspensão inicial em pfu/mL para cada diluição avaliada
 - a. Estabelecer o título da suspensão viral inicial por média dos valores encontrados



Registo de observações e Resultados

TITULAÇÃO DE SUSPENSÃO DE BACTERÍOFAGOS – FORMAÇÃO DE PLACAS

Operador: _____ Data: ____/____/____

Placa	Amostra	Número de placas contadas	Título da suspensão inicial	Observações
#X				
#X+1				
#X+2				
Média				

Notas:



TITULAÇÃO DE SUSPENSÃO DE BACTERÍOFAGOS - DILUIÇÃO LIMITE

Introdução

Inoculando diversas culturas líquidas de bactérias hospedeiras com diluições crescentes da suspensão viral em estudo, atinge-se um ponto a partir do qual não mais é possível detectar partículas virais. Determinando a diluição da suspensão que ainda contem pelo menos uma partícula viral é possível calcular a concentração da suspensão inicial.

Material e reagentes específicos

- Suspensão de bacteriófago lítico de *E. coli* (T4)
- Cultura recente de *E. coli* em meio nutritivo (dia anterior)
- Soro fisiológico estéril
- Tubos de cultura contendo 5 mL de agar nutritivo líquido
- Microtubos eppendorf esterilizados
- Micropipetas (200 e 1000) e respectivas pontas esterilizadas

Procedimento

1. Em microtubos estéreis, identificados de 1 a 12, preparar as seguintes diluições decimais:

Tubo #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Amostra inicial (μL)	150	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diluição anterior (μL)	-	-	100	100	100	100	100	100	100	100	100	-
Soro fisiológico (μL)		900	900	900	900	900	900	900	900	900	900	900
Diluição final	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹	cont rolo

2. Em microtubo esterilizado misturar:
 - a. 0,3 mL de cultura bacteriana em crescimento exponencial
 - b. 0,1 mL de cada diluição de bacteriófago
 - c. Misturar no vortex e incubar em banho-maria a 37°C durante 5 minutos
3. Marcar adequadamente os tubos de ensaio contendo 5 mL de meio de cultura líquido
 - a. Inocular cada tubo com a totalidade de cada suspensão bacteriana infectada.
 - b. Misturar no vortex.
 - c. Incubar em banho-maria com agitação (ou em incubadora com agitação) a 37°C durante 24 horas (conservar no frigorífico até à sessão seguinte)
4. Observar a turvação das culturas
 - a. Registrar as observações
5. Calcular o título da suspensão inicial
 - a. Comparar criticamente com o título calculado pela técnica de formação de placas



Registo de observações e Resultados

TITULAÇÃO DE SUSPENSÃO DE BACTERIÓFAGOS – DILUIÇÃO LIMITE

Operador: _____ Data: ____/____/____

<i>Tubo</i>	<i>Amostra</i>	<i>Turvação (+/-)</i>	<i>Observações</i>
#1			
#2			
#3			
#4			
#5			
#6			
#7			
#8			
#9			
#10			
#11			
#12			
Título da suspensão viral inicial:			

Notas:



CURVA DE CRESCIMENTO DE UM BACTERIÓFAGO LÍTICO

Introdução

O aspecto típico de uma curva de crescimento de bactérias mostra um crescimento constante do número de indivíduos na fase exponencial, que decorre durante um determinado período de tempo correspondente a gerações sucessivas de indivíduos. Por esgotamento dos nutrientes no meio ou pelo desenvolvimento de outras condições adversas (pH, acumulação de produtos tóxicos, etc.), o crescimento bacteriano é inibido.

A replicação de um vírus lítico na bactéria desenvolve-se num único passo conducente à morte do hospedeiro e libertação dos fagos para o meio envolvente. Este fenómeno que ocorre numa única célula infectada pode ser demonstrado numa população de microrganismos se todos os indivíduos forem infectados ao mesmo tempo.

A multiplicidade de infeção – MOI (*multiplicity of infection*) é um conceito que relaciona o número de partículas virais infecciosas usadas para infetar um determinado número de células hospedeiras. Uma MOI de 1.0 corresponde a uma situação de uma partícula viral infecciosa por célula.

Neste trabalho determina-se o perfil de crescimento de um bacteriófago lítico.

Material e reagentes específicos

- Suspensão de bacteriófago lítico de *E. coli* (T4) preparado no trabalho anterior
- Cultura recente de *E. coli* (ATCC 25250) em meio nutritivo (dia anterior)
- Soro fisiológico estéril
- Placas de Petri com agar nutritivo
- Tubos de ensaio contendo 5 mL de agar nutritivo semissólido (0,75%) fundido e em banho a 50°C
- Tubos de centrifuga (10 mL mínimo), Microtubos eppendorf, Micropipetas (200 e 1000) e pontas esterilizadas

Procedimento (cultura de vírus)

1. Inocular frasco erlenmeyers contendo 50 mL de meio nutritivo com 2 mL de cultura bacteriana recente.
2. Incubar a 37°C, sob agitação, até crescimento exponencial (O processo demora entre 3 a 5 horas até que a cultura comece a duplicar a sua densidade – crescimento exponencial. Face às limitações de tempo de duração de uma aula prática, usar em alternativa uma cultura de bactérias do dia anterior).
3. Avaliar a DO da suspensão bacteriana
4. Avaliar a quantidade de bactérias existentes em 10 ml de suspensão
5. Tomar 10 mL de cultura para cada um de dois tubos de centrifuga estéreis (Tubos 1 e 2)
6. Adicionar suspensão viral suficiente para atingir uma MOI de 5 a 10 no tubo 1
7. Adicionar igual volume de meio de cultura LB ao tubo 2
8. Incubar 37°C durante 5 minutos
9. Centrifugar 1500 rpm X 5 minutos. Decantar os sobrenadantes para tubos estéreis
10. Preservar sobrenadante de tubo 1 e conservar a 4°C
11. Conservar o sedimento bacteriano seco a 4°C para a aula seguinte (Necessário por falta de tempo na aula)
12. Ressuspender o sedimento de cada tubo com 20 mL de meio de cultura pré-aquecido.
13. Transferir a suspensão de cada tubo para frascos Erlenmeyer
14. Incubar a 37°C sob agitação
15. Tomar assepticamente as amostras seguintes ao tempo 0 (zero):
 - a. Da cultura bacteriana inoculada com vírus (tubo 1):
 - i. Amostra de 1 mL de suspensão. Ler a DO₆₀₀. Registar leitura.
 - ii. Amostra de 0,5 mL de suspensão. Conservar a 4°C
 - b. Da cultura bacteriana não inoculada com vírus (tubo 2):
 - i. Amostra de 1 mL de suspensão. Ler a DO₆₀₀. Registar leitura.
16. Repetir passo 15 de cada 15 minutos até ao fim da aula



Procedimento (revelação)

1. Material biológico necessário conservado a 4°C:
 - a. Sobrenadante da cultura inicial dos vírus
 - b. Uma amostra de suspensão bacteriana de tempo 0 (zero)
 - c. Uma amostra de suspensão bacteriana de cada tempo recolhido
2. Face à quantidade de vírus e bactérias inicialmente utilizados calcular as diluições a fazer para cada caso
3. Proceder à diluição de cada amostra a estudar de acordo com o seguinte esquema e em função da diluição máxima necessária:

Tubo #	1	2	2	2	2	...	N
Soro fisiológico	900 µL	900 µL	900 µL	900 µL	900 µL	900 µL	900 µL
Sobrenadante (sessão anterior)	100 µL	-	-	-	-	-	-
Diluição anterior	-	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	-

4. Selecionar de cada amostra as três diluições para inocular nas bactérias
5. Em eppendorfs esterilizados:
 - a. 300 µL de suspensão bacteriana recente
 - b. 100 µL da diluição da suspensão viral em estudo
 - c. Homogeneizar
6. Repetir passo 5 para todas as amostras a testar
7. Incubar os tubos a 37°C durante 5 minutos
8. Pipetar a totalidade do conteúdo de cada eppendorf para tubo de ensaio contendo agar semissólido liquefeito e aquecido a 50°C
9. Rolar o tubo entre as mãos para homogeneizar
10. Verter de imediato na superfície de uma placa de agar nutritivo previamente marcada
11. Homogeneizar e deixar solidificar à temperatura ambiente (15 a 20 minutos)
12. Incubar em estufa a 37°C durante 24 horas (conservar no frigorífico até à sessão seguinte)
13. Repetir procedimentos de 8 a 12 para todas as amostras selecionadas.
14. Observar as placas de Petri e contar o número de placas virais
15. Registrar as observações e os resultados
16. Calcular a média do número de partículas virais por mL de cada sobrenadante inicial
17. Preparar a curva de crescimento do bacteriófago.
18. Determinar o período de explosão (*burst size*)



Registo de observações e Resultados

CURVA DE CRESCIMENTO DE UM BACTERÍÓFAGO LÍTICO

Operador: _____ Data: ____/____/____

Sobrenadante _____

Amostra (Diluições)	Tempo de infecção	Contagens de placas virais		
		Placa de Petri X-1	Placa de Petri X	Placa de Petri X+1
Inicial (_____)	-			
1 (_____)	0			
2 (_____)				
3 (_____)				
4 (_____)				
5 (_____)				
6 (_____)				

Notas:



REVELAÇÃO DE VÍRUS VEGETAL (TMV)

Introdução

O TMV (Tobacco Mosaic Vírus) é um vírus simples helicoidal, de genoma a RNA de cadeia simples que infecta as plantas do tabaco e do tomateiro além de outros tipos de plantas. Foi o primeiro vírus a ser identificado, purificado e cristalizado e é dos vírus mais estudados. A infeção viral causa lesões localizadas nas folhas, dando-lhes um aspecto heterogéneo (mosaico), podendo também causar infeção sistémica se transmitido à planta inteira. Devido à existência de uma parede celular rígida (celulósica) nas células vegetais, a infeção só pode estabelecer-se quando ocorre rotura nessa parede, na presença do vírus infeccioso.

Neste trabalho pretende-se pesquisar a presença de TMV em produtos comerciais de tabaco por abrasão das folhas da planta.

Material e reagentes específicos

- Vasos com plantas do tabaco em crescimento (1 por grupo)
- Produtos de tabaco comerciais (cigarros, charutos, tabaco de cachimbo), de diferentes fabricantes.
- Almofariz e pistão
- Soro fisiológico
- Areia fina
- Algodão esterilizado (bolas)

Procedimento

1. Identificar o vaso de cada grupo
2. Pendurar uma pequena etiqueta em cada um de dois ramos da planta, marcadas com controlo e teste
3. “Pisar” uma porção de tabaco (um cigarro desfeito) no almofariz com uma pequena porção de soro fisiológico
4. Aspergir soro fisiológico numa das folhas do ramo marcado como controlo.
5. Espelhar uma pequena porção de areia muito fina sobre a folha molhada
6. Embeber uma bola de algodão com soro fisiológico
7. Esfregar ligeiramente a folha da planta com o algodão
8. Repetir os passos 4. e 5. numa folha do ramo marcado como teste
9. Embeber uma bola de algodão com o macerado de tabaco preparado
10. Esfregar ligeiramente a folha da planta com o algodão
11. Cuidar da manutenção da planta
12. Observar semanalmente as folhas utilizadas no ensaio
13. Registar as observações efetuadas



Registo de observações e Resultados

REVELAÇÃO DE VÍRUS VEGETAL (TMV)

Operador: _____ Data: ____/____/____

	<i>Observações</i>	
Data	Folha controlo	Folha teste

Conclusão:

Notas:



ISOLAMENTO DE BACTERÍOFAGO SELVAGEM (TRABALHO FINAL AUTÓNOMO)

Introdução

Como parasitas intracelulares obrigatórios, os vírus encontrar-se-ão nos mesmos ecossistemas naturais onde se desenvolvem os seus hospedeiros.

Os coliformes são bactérias que se encontram em grandes quantidades no trato intestinal dos mamíferos, pelo que é de esperar encontrar bacteriófagos de *E. coli* na matéria fecal não tratada ou em insectos que a povoem.

É objetivo desta experiência demonstrar a presença de fagos líticos de *E. coli*, em dejetos de mamíferos e capacitar os estudantes para a realização de um trabalho autónomo em Virologia.

Material e reagentes específicos

— Matéria fecal, macerado de moscas, etc.	— Estufa de incubação a 37°C
— Meio de cultura TYG (1% triptona; 0.5% extrato de levedura; 0,2% glucose)	— Soro fisiológico estéril
— Cultura recente de <i>E. coli</i> (JF335) em meio TYG (dia anterior)	— Placas de Petri com agar em TYG
— Cultura recente de <i>E. coli</i> (JF417) em meio TYG (dia anterior)	— Tubos de ensaio contendo 5 mL de agar nutritivo semi-sólido (0,75%) fundido e em banho a 50°C
— Banho-maria a 50°C e a 42°C	— Tubos de ensaio esterilizados (10 mL mínimo)
	— Microtubos eppendorf esterilizados
	— Micropipetas (200 e 1000) e respectivas pontas esterilizadas

Procedimento sugerido

Enriquecimento

1. Tomar “uma noz” de matéria fecal, 50 mL de fluido recolhido do esgoto não tratado (doméstico, de exploração pecuária ou outro) ou uma dúzia de moscas domésticas.¹
2. Homogeneizar e macerar o material sólido em 25 mL de soro fisiológico. Tomar amostra de cerca de 25 mL de material líquido ou pastoso
3. Centrifugar 5000 rpm X 10 minutos. Recuperar sobrenadante.
4. Repetir centrifugação até sobrenadante límpido.
5. A 20 mL de suspensão límpida adicionar:
 - a. 2,5 mL de LB 10X concentrado
 - b. 2,5 mL de cultura de *E. coli* recente
6. Incubar a 37°C durante 24 horas (guardar no frigorífico até à sessão seguinte, se necessário)

Clarificação

1. Centrifugar 20 mL de suspensão a 5000 rpm X 10 minutos. Recuperar o sobrenadante
2. Repetir a centrifugação até à clarificação do sobrenadante
3. Esterilizar sobrenadante, por filtração (usar seringa e filtro de 0,22 µm) até colmatação do filtro
4. Homogeneizar todas as amostras
5. Conservar a 4°C

¹ Tratar o material recolhido do esgoto como potencialmente infeccioso para o homem. Usar luvas e evitar o contato direto.



Amplificação de vírus

Preparar uma suspensão viral de alto título

Isolamento de vírus

Se à observação for evidente a existência de diferentes tipos de placas virais (opacidade e dimensões), selecionar apenas um tipo e amplificar

Titulação

Titular as suspensões obtidas, tentando reportar aos níveis de contaminação do material biológico inicialmente utilizado.

Curva de crescimento do vírus

Estabelecer a curva de crescimento do vírus isolado.



Registo de observações e Resultados

ISOLAMENTO DE BACTERIÓFAGO SELVAGEM

Operador: _____ Data: ____/____/____

Enriquecimento _____

Clarificação _____

Titulação / Isolamento _____

Amplificação _____

Titulações específicas _____

Curva de crescimento _____

Notas:



APÊNDICE – MEIOS DE CULTURA (FÓRMULAS)

Meio de cultura LB (stock)

LB 10X:

Bacto-triptona	100 g
Extrato de levedura	50 g
NaCl	100 g
H2O destilada até	1000 mL

pH 7,5.

Autoclavar. Conservar estéril a 4°C.

Meio LB líquido

Meio LB 10X	100 mL
Água destilada estéril	900 mL

Conservar estéril a 4°C.

Agar LB semi-sólido

Meio LB líquido 1000 mL

Agar 7,5 g

Autoclavar. Distribuir assepticamente por placas de Petri. Conservar a 4°C.

Agar LB nutritivo

Meio LB líquido 1000 mL

Agar 7,5 g

Autoclavar. Distribuir assepticamente por placas de Petri. Conservar a 4°C.

Carlos Sinogas